



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA NEVES PADUAN

**TEMPERATURA NA PATOGENICIDADE DE *Pantoea ananatis* EM PLANTAS DE
MILHO E NA EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA**

Londrina, Paraná

2024

FERNANDA NEVES PADUAN

**TEMPERATURA NA PATOGENICIDADE DE *Pantoea ananatis* EM PLANTAS DE
MILHO E NA EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Agronomia da Universidade Estadual de
Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Aline Vanessa Sauer
Zawadzki

Londrina, Paraná
2024

FERNANDA NEVES PADUAN

**TEMPERATURA NA PATOGENICIDADE DE *Pantoea ananatis* EM PLANTAS DE
MILHO E NA EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Agronomia da Universidade Estadual de
Londrina como requisito parcial da obtenção do
título de Doutora em Agronomia.

Banca avaliadora

Prof. Orientador
Dr. Marcelo Giovanetti Canteri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Maria Isabel Balbi-Peña
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Rui Pereira Leite
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná
(IDR-Paraná)

Dra. Alessandra Alves de Souza
Instituto Agronômico de Campinas
(IAC)/Unicamp

Prof. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi
Universidade Federal de Uberlândia

Londrina, 23 de fevereiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão a todos que desempenharam um papel fundamental no desenvolvimento desta Tese. Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri e co-orientadora Prof^a Dra. Aline Vanessa Sauer Zawadzki pela confiança e incentivo, que foram essenciais para a conclusão e para aprimorar a qualidade desta pesquisa. Em especial, agradeço a dois colaboradores, Dra. Viviane Yumi Baba e Dr. Juarez Pires Tomaz, que não mediram esforços ao compartilhar seus conhecimentos.

Agradeço aos membros da banca avaliadora, Dra. Alessandra Alves de Souza, Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi, Dr. Rui Pereira Leite e Dra. Maria Isabel Balbi-Peña, que dedicaram seu tempo para avaliar e analisar os aspectos deste estudo, a fim de contribuir e elevar a qualidade da pesquisa.

À minha família, que ofereceu o apoio para a finalização desta jornada. Em especial, ao apoio e incentivo do meu esposo Luan K. S. Wakatsuki, que tornou esta trajetória muito mais leve e, principalmente, possível. Às minhas amigas, Bianca O. Martins, Bruna O. Martins, Bárbara O. Martins e Bárbara Palharini, pela amizade e acolhimento durante esta trajetória.

Agradeço aos colegas, estagiários e técnico do Laboratório de Fitopatologia da UEL que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho. Em especial ao Maicon F. Petry, Gabriel C. Francisco e Maria Carolina O. Lourenço pela amizade e comprometimento. Agradeço ao colega Gabriel Danilo Shimizu por gentilmente compartilhar sua competência estatística.

Minha sincera gratidão aos laboratórios que tive a honra de integrar ao longo desta jornada e que contribuíram para meu crescimento. À equipe de técnicos, pesquisadores e estagiários do Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-Paraná), pela oportunidade de contribuir, aprender e compartilhar conhecimento e experiências. Assim como à toda equipe do Laboratório de Bacteriologia do IDR-PR, pelo acolhimento e pela valiosa troca de informações.

Agradeço aos membros da Estação Dashen pela colaboração e apoio, em especial ao Dr. Robinson Osipe, Dr. Jethro B. Osipe e Dr. Petrus B. Osipe. Ao prof. Dr. Rone Batista de Oliveira, coordenador do Núcleo de Investigação em Tecnologia de Aplicação e Máquinas Agrícolas (NITEC), da Universidade Estadual do Norte do Paraná, por gentilmente disponibilizar equipamentos para análises de experimentos.

Agradeço também pela contribuição do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Uberlândia, coordenado pela prof. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi, por ceder isolados bacterianos de *Pantoea ananatis* para este estudo.

Este trabalho reflete não apenas meu esforço, mas a colaboração e apoio de toda uma comunidade dedicada à pesquisa e ao conhecimento.

PADUAN, Fernanda Neves. **Temperatura na patogenicidade de *Pantoea ananatis* em plantas de milho e na expressão de genes de virulência.** 2024. 78f. Tese – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

Temperaturas baixas podem aumentar a severidade da mancha branca do milho, causada pela bactéria *Pantoea ananatis* e uma das principais doenças da cultura. O objetivo deste estudo foi investigar a dinâmica populacional e expressão gênica de *Pantoea ananatis* em resposta à exposição a diferentes temperaturas. Inicialmente, foi extraído e quantificado o DNA das bactérias isoladas para identificações quanto à espécie e à presença do gene *inaA*. Posteriormente, foram realizados testes de patogenicidade em milho e tabaco. A dinâmica populacional da bactéria *in vitro* foi analisada sob diferentes temperaturas, determinando a concentração de células por densidade óptica (absorbância) e contagem de células viáveis pela técnica de microgota. A população bacteriana em milho sob influência de temperatura também foi analisada, coletando folhas em diferentes intervalos de tempo após a inoculação e avaliando o número de Unidades Formadoras de Colônias por 0,1g de tecido foliar. Concomitantemente, foi analisada por RT-qPCR a expressão de genes de virulência da bactéria inoculada em milho submetido a diferentes temperaturas. Os genes analisados incluíram aqueles relacionados a motilidade, formação de biofilme, *quorum sensing* e outros aspectos patogênicos. A frequência de isolamento de *P. ananatis* a partir de lesões características de mancha branca foi de 76,6%. Dos 30 isolados de *Pantoea ananatis* avaliados, os isolados MS2.7 e F6.1 não apresentaram o gene *inaA*. Isolados como MS2.3, F1.1 e MS3.1, mesmo com o gene *inaA*, não causaram sintomas em tabaco ou milho. Variações térmicas impactaram significativamente a densidade populacional da bactéria *in vitro* e *in planta*, com destaque para a duplicação da população em plantas submetidas a choques térmicos. A queda de temperatura intensificou a severidade das lesões em milho, ressaltando o papel desse fator ambiental na patogenicidade de *P. ananatis*. A expressão dos genes *hmsP* e *cspD* em *P. ananatis* foi mais induzida em plantas expostas a choques térmicos (25 °C com períodos de 15 °C a cada 12 horas), evidenciando maior formação de biofilme e produção de proteínas de choque frio. Houve aumento significativo na expressão de *motA* e *fliM* relacionados à motilidade bacteriana, sendo 24 vezes maior em plantas submetidas a choque frio. O gene do Sistema de Secreção Tipo VI funcional (*T6SS*) teve aumento significativo na expressão em plantas sob choque frio, destacando-se nas 48 horas após a inoculação. A redução de temperatura não afetou a expressão do gene envolvido com *quorum sensing*. Este estudo destaca o impacto de baixas temperaturas na dinâmica populacional, maior severidade de lesões, virulência e expressão diferencial de genes de *P. ananatis* em milho.

Palavras-chave: Dinâmica populacional. Impacto térmico. Mancha Branca do Milho. Nucleação de gelo. *Zea mays*.

ABSTRACT

Low temperatures may increase the severity of maize white spot, caused by the bacterium *Pantoea ananatis*, one of the main diseases affecting the crop. The aim of this study was to investigate the population dynamics and gene expression of *P. ananatis* in response to exposure to different temperatures. Initially, DNA was extracted and quantified from isolated bacteria for species identification and detection of the *inaA* gene. Subsequently, pathogenicity tests were conducted on maize and tobacco. Bacterial population dynamics in vitro were analyzed under different temperatures, determining cell concentration by optical density (absorbance) and viable cell count using the microdrop technique. The bacterial population in maize under temperature influence was also analyzed by collecting leaves at different time intervals after inoculation and assessing the number of Colony Forming Units per 0.1g of leaf tissue. Concurrently, the expression of virulence genes of the inoculated bacteria in maize subjected to different temperatures was analyzed by RT-qPCR. The analyzed genes included those related to motility, biofilm formation, quorum sensing, and other pathogenic aspects. The isolation frequency of *P. ananatis* from characteristic white spot lesions was 76.6%. Out of the 30 *Pantoea ananatis* isolates evaluated, isolates MS2.7 and F6.1 did not present the *inaA* gene. Isolates such as MS2.3, F1.1, and MS3.1, even with the *inaA* gene, did not cause symptoms in tobacco or maize. Thermal variations significantly impacted the bacterial population density in vitro and in planta, with a doubling of the population in plants subjected to thermal shocks. Temperature decrease intensified lesion severity in maize, highlighting the role of this environmental factor in *P. ananatis* pathogenicity. The expression of *hmsP* and *cspD* genes in *P. ananatis* was more induced in plants exposed to thermal shocks (25 °C with periods of 15 °C every 12 hours), evidencing increased biofilm formation and cold shock protein production. There was a significant increase in the expression of *motA* and *fliM* genes related to bacterial motility, being 24 times higher in plants subjected to cold shock. The functional Type VI Secretion System (T6SS) gene showed a significant increase in expression in plants under cold shock, particularly at 48 hours after inoculation. Temperature reduction did not affect the expression of the gene involved in quorum sensing. This study highlights the impact of low temperatures on the population dynamics, increased lesion severity, virulence, and differential gene expression of *P. ananatis* in maize.

Key words: Ice Nucleation. Maize White Spot. Population Dynamics. Thermal Impact. *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios 1, 2, 3 e 4 de lesões da mancha branca do milho causada pela bactéria <i>Pantoea ananatis</i>	19
Figura 2. O processo de infecção de bactérias em plantas. 1. Sobrevivência epifítica e formação de biofilme. 2. Migração impulsionada por flagelos/pili através das superfícies das plantas para locais de entrada apoplástica. 3. Liberação de fitotoxinas para contornar o fechamento estomático. 4. Nucleação de gelo para danificar as superfícies das plantas. 5. Secreção de enzimas extracelulares para degradar as paredes celulares e permitir a entrada do patógeno no tecido vegetal. 6. Secreção de fitotoxinas para modificar a fisiologia, o metabolismo e as respostas de defesa das plantas.	24
Figura 4. Gel de agarose a 2%, produtos da PCR da região do gene 16-23S rRNA de <i>Pantoea ananatis</i> , amplificando um produto de 360-380 pares de base.	42
Figura 5. Gel de agarose a 2%, de produtos de PCR com a região do gene <i>inaA</i> de <i>Pantoea ananatis</i> , amplificando um produto de 350-400 pares de base.	43
Figura 6. Teste de hipersensibilidade de isolados bacterianos em tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi). A necrose do tecido confirma a patogenicidade dos isolados.	45
Figura 7. Teste de patogenicidade de isolados bacterianos (10^8 UFC. mL ⁻¹) em folhas de milho (Fórmula – Syngenta®) aos sete dias após a inoculação através do método de infiltração.....	46
Figura 8. Absorbância (OD ₆₀₀) em espectrofotômetro do crescimento de <i>P. ananatis</i> em regimes de temperatura. Legenda: h=horas; m=minutos; OD ₆₀₀ =densidade óptica a 600 nm. Barras de erro representam o erro padrão da amostra.	47
Figura 9. Unidades Formadoras de Colônias (UFC). mL ⁻¹ do isolado UFU B13 de <i>P. ananatis</i> em tratamentos com regimes de temperatura. Legenda: h=horas; m=minutos. Barras de erro representam o erro padrão da amostra	48
Figura 10. Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>Pantoea ananatis</i> (isolado UFU B13) em 0,1g de tecido foliar de plantas de milho inoculadas e submetidas a regimes de temperaturas. Barras de erro indicam o erro padrão da amostra.	51
Figura 11. Severidade de lesões causadas por <i>P. ananatis</i> (isolado UFU B13) inoculada em folhas de milho (Fórmula - Syngenta®) e mantidas sob diferentes regimes térmicos. (A-D) Testemunha sem inoculação (B-E) plantas mantidas a 25/15 °C a cada 12 h e (C) plantas mantidas a 25 °C. (D-F) leitura da área foliar afetada mensurada pelo sistema de análise foliar Windias®.	53

Figura 12. Média de severidade (%) de lesões em folhas de milho inoculadas com <i>P. ananatis</i> (isolado UFU B13) submetidas a 25 °C ou 25/15 °C a cada 12h. Barras representam o desvio padrão da amostra e letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	54
Figura 13. Plantas de milho inoculadas com <i>Pantoea ananatis</i> (isolado UFU B13). (A) Testemunha sem inoculação (B) plantas mantidas a 25/15 °C a cada 12h e (C) plantas mantidas a 25 °C.....	55
Figura 14. Expressão dos genes relacionados à (A) formação do biofilme (<i>hmsP</i>) e (B) proteínas de choque frio (<i>cspD</i>) da bactéria <i>Pantoea ananatis</i> em plantas de milho e submetidas a regimes de temperatura. * indica diferença entre médias comparadas pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade.....	58
Figura 15. Expressão dos genes relacionados à (A e B) motilidade (<i>motA</i> e <i>fliM</i>) e (C) quorum sensing (<i>eanL</i>) da bactéria <i>Pantoea ananatis</i> em plantas de milho e submetidas a regimes de temperatura. * indica diferença entre médias comparadas pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade.....	60
Figura 16. Expressão dos genes relacionados ao (A) Sistema de Secreção tipo VI (<i>tagH</i>) e (B) protease omptin (<i>omptin</i>) da bactéria <i>Pantoea ananatis</i> em plantas de milho e submetidas a regimes de temperatura. * indica diferença entre médias comparadas pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação, origem e ano de isolamento de <i>Pantoea ananatis</i> em milho com sintomas de mancha branca utilizados neste estudo.....	34
Tabela 2. Primers usados para identificação de isolados de <i>Pantoea ananatis</i> de milho e para detecção da presença do gene <i>inaA</i> por PCR.	36
Tabela 3. Tratamentos térmicos para avaliação da densidade populacional de <i>Pantoea ananatis</i> isolado UFU B13	37
Tabela 4. Primers utilizados para análise de expressão gênica por -RT-qPCR,.....	40
Tabela 5. Caracterização de isolados bacterianos de milho quanto a espécie <i>Pantoea ananatis</i> e presença do gene de nucleação de gelo (<i>inaA</i>), teste de hipersensibilidade em tabaco e patogenicidade em milho	44
Tabela 6. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL e aumento absoluto e relativo (%) do crescimento bacteriano de <i>P. ananatis</i> UFU B13 em diferentes regimes de temperaturas.....	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 CULTURA DO MILHO (<i>Zea mays</i>)	16
2.2 MANCHA BRANCA DO MILHO	17
2.2.1 Sintomatologia	18
2.2.2 Condições Para o Desenvolvimento da Mancha Branca do Milho.....	20
2.2.3 Manejo da Doença	21
2.2.4 Etiologia da Doença.....	22
2.3 <i>Pantoea ananatis</i>	22
2.3.1 Patogênese Bacteriana	23
2.3.1.1 Aclimação ao choque térmico frio.....	24
2.3.1.2 Biofilme	26
2.3.1.3 Motilidade.....	26
2.3.1.4 <i>Quorum sensing</i>	27
2.3.1.5 Sistema de Secreção Tipo VI.....	28
2.3.1.6 Nucleação de gelo e proteína omptin	28
3 ARTIGO A: BAIXAS TEMPERATURAS REGULAM A DENSIDADE POPULACIONAL E AUMENTAM A EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE <i>Pantoea ananatis</i> EM MILHO	30
3.1 RESUMO	30
3.2 ABSTRACT:	31
3.3 INTRODUÇÃO.....	31
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.4.1 Isolamento de <i>Pantoea ananatis</i>	33
3.4.2 Identificação E Caracterização Molecular Dos Isolados.....	35
3.4.3 Teste De Patogenicidade	36
3.4.4 Temperaturas Na Dinâmica Populacional De <i>Pantoea ananatis in vitro</i>	37
3.4.5 Temperaturas Na Densidade Populacional De <i>Pantoea ananatis</i> em Milho.	38
3.4.6 Temperaturas Na Severidade De Lesões De <i>Pantoea ananatis</i> Em Milho....	39
3.4.7 Temperaturas Na Expressão De Genes De Virulência De <i>Pantoea ananatis</i> Em Milho	40
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.5.1 Identificação, Caracterização Molecular De Isolados E Teste De Patogenicidade De <i>Pantoea ananatis</i>	41

3.5.2 Temperaturas Na Densidade Populacional de <i>Pantoea ananatis</i> <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	46
3.5.3 Queda De Temperatura Na Severidade De Lesões Causadas Por <i>Pantoea ananatis</i> Em Milho.....	53
3.5.4 Temperaturas Na Expressão De Genes De Virulência De <i>Pantoea ananatis</i> Em Milho	57
3.6 CONCLUSÃO.....	63
5 CONCLUSÕES GERAIS	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

Anteriormente considerada uma cultura resistente à doenças, o milho passou por uma mudança de perspectiva devido a uma epidemia de cercosporiose nos anos 2000 (COTA et al., 2013). A ausência de rotação de culturas, o sistema de plantio direto e o uso de cultivares suscetíveis contribuíram para perdas significativas. O aumento na produção, cultivo contínuo e clima favorável propiciam a crescente importância das doenças no milho (CASA, REIS, ZAMBOLIM, 2006).

A mancha branca, antes uma preocupação secundária, tornou-se uma das principais doenças. Esta doença afeta estágios iniciais da cultura e causa reduções significativas na produtividade devido à senescência foliar precoce. Severidades de 10-20 % podem reduzir a fotossíntese em até 40 %, e, além disso, estimam-se reduções de até 60% na produção da cultura (CASELA, FERREIRA, PINTO, 2006; GODOY et al., 2001).

Inicialmente descrita como causada por *Phaeosphaeria maydis*, evidências sugerem que a presença deste fungo seja oportunista, desenvolvendo-se na lesão causada pela bactéria *Pantoea ananatis*. Estudos demonstraram sintomas típicos da mancha branca quando inoculada a bactéria *P. ananatis*, além do reisolamento exitoso da bactéria a partir dessas lesões (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; PACCOLA-MEIRELLES, 2008; BOMFETI et al., 2008). A identificação molecular da bactéria é relatada desde o estágio inicial de lesões da doença, enquanto a presença do fungo foi observada apenas em estádios mais avançados (GONÇALVES et al., 2013).

A bactéria *P. ananatis* é considerada um patógeno emergente, relatada como agente causal de diversas doenças em culturas como arroz (MONDAL et al., 2011; KINI et al., 2017), cebola (CARR et al., 2010), melão (KIDO et al., 2008), milho (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; PÉREZ-Y-TERRÓN et al., 2009; ALIPPI; LÓPEZ, 2010), morango (ABDEL-GAIED et al., 2022), eucalipto (COUTINHO et al., 2002) e trigo (KRAWCZYK et al., 2010). Entretanto, há relatos da presença endofítica em tecidos vegetais de milho, sem mesmo demonstrar sintomas (RIJAVEC et al., 2007), além de promover o crescimento vegetal em algumas culturas (KIM et al., 2012b; SILVA et al., 2015; LU et al., 2021).

Bactérias epifíticas frequentemente se encontram expostas à dessecação, radiação ultravioleta e variações de temperatura e precisam desenvolver mecanismos de adaptação para sobreviver (PFEILMEIER, CALY, MALONE, 2016). A bactéria *P. ananatis*,

psicrotrófica, podendo crescer entre 4 e 30 °C, adaptando-se ao frio com estratégias que incluem alterações na membrana plasmática. A adaptação à baixa temperatura envolve a regulação positiva de genes relacionados às proteínas de choque frio (*Csps*), que permitem a aclimatação da bactéria e mantêm a fluidez da membrana, além de auxiliar em processos metabólicos. Além disso, proteínas de choque frio podem regular genes de virulência de bactérias (WU et al., 2019; WEI, SAWYER, BURBANK, 2021). A expressão de genes dependente da temperatura é crucial para entender a patogenicidade bacteriana, especialmente em patógenos de plantas, que ativam fatores de virulência em baixas temperaturas (KONKEL; TILLY, 2000; SMIRNOVA et al., 2001).

Embora condições ambientais com temperaturas próximas a 0 °C ocorram eventualmente no outono-inverno no Centro Sul do Brasil, sabe-se que temperaturas amenas ou oscilações na amplitude da temperatura possibilitam maior severidade da macha branca do milho (COSTA et al., 2013). Pouco se sabe sobre como a temperatura influencia na expressão de genes de virulência de *P. ananatis*, relacionados com a patogenicidade da bactéria. O efeito da temperatura deve ser estudado para genes essenciais para a patogenicidade e virulência da bactéria, como exemplo àqueles relatados para *P. ananatis*, *quorum sensing* (SIBANDA et al., 2016; SIBANDA et al., 2018), motilidade flagelar (WELLER-STUART et al., 2016) e Sistema de Secreção Tipo VI (SHYNTUM et al., 2015) e outros. Informações sobre a influência do ambiente nas expressões genotípicas do patógeno são essenciais para o entendimento da epidemiologia da doença.

O objetivo foi avaliar a influência da temperatura no processo patogênico de *Pantoea ananatis*, através da caracterização de isolados bacterianos quanto à presença e influência do gene de nucleação de gelo (*inaA*) na patogenicidade, assim como regimes de temperatura na dinâmica populacional da bactéria *in vitro* e *in vivo*, na severidade de lesões em milho e na expressão de genes de virulência da bactéria.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DO MILHO (*Zea mays* L.)

Um dos cereais mais cultivados no mundo, o milho (*Zea mays*) está presente em todos os estados do Brasil. É comumente cultivado e colhido durante duas safras, no entanto, a terceira safra já é realidade na região Norte e Nordeste do Brasil desde 2019. O milho conhecido como de primeira safra ou de verão, é tipicamente semeado entre setembro e dezembro e colhido entre janeiro e maio. O cultivo do milho de segunda safra ou “safrinha”, no entanto, é cultivado durante o outono e inverno do Hemisfério Sul, entre os meses de janeiro a julho e colhido entre julho e agosto. Por sua vez, o cultivo da terceira safra ocorre entre abril e maio, com colheita entre novembro e janeiro (CONAB, 2023a).

A importância do milho safrinha tomou grandes proporções a partir de meados de 1970 e 1980, quando ocorria o cultivo de soja durante o verão e, devido ao clima quente e extensão das chuvas, viabilizava-se o cultivo de milho durante o outono e inverno. Como cultivo da soja se expandiu devido à forte demanda e alta rentabilidade, o cultivo de milho se concentrou na segunda safra. Inicialmente referido como “safrinha” atribuído ao pequeno volume e em relação à produção do milho de verão, atualmente este representa quase três quartos da produção total de milho no Brasil. O milho de verão apresenta-se responsável por apenas um quarto da produção, enquanto a participação do milho terceira safra ainda é relativamente pequena, estimado em 5,6% (USDA, 2022; CONAB, 2023a).

O Brasil é o terceiro maior produtor e exportador de milho no mundo (USDA, 2022). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2023a), a safra de verão 2022/2023 apresentou decréscimo de 2,3% em áreas plantadas em comparação à safra anterior, no entanto, apresentou aumento de 9,4% na produção, totalizando 27.373,2 mil toneladas do grão. De acordo com a Companhia, o acréscimo em produção foi consequência do clima mais favorável e da melhor eficiência produtiva do setor.

Para o milho segunda safra (2022/2023), as produtividades superaram as da safra anterior. Os números de área plantada, produção, e produtividade são recordes registrados pela CONAB para a segunda safra de milho, com cerca de 17.179,6 mil hectares de milho segunda safra, expectativa de colheita de 102.164,5 mil toneladas e produtividade média

de 5.947 kg. ha⁻¹. No Mato Grosso foi registrado recorde de produtividade, com média de 6.886 kg. ha⁻¹ e produção de 50.731,2 mil toneladas (CONAB, 2023a).

Embora a maior produção de milho seja advinda da safrinha, a produtividade da primeira safra foi relativamente maior nos últimos anos (CONAB, 2023b). Segundo a USDA (2022), diversos fatores podem estar relacionados. Um destes fatores seria um possível atraso na colheita da soja e consequentemente atraso na semeadura do milho, o que implica em plantio fora da janela ideal, sujeitando a cultura a condições desfavoráveis. Outro ponto se deve ao fato de grande parte do milho safrinha ser cultivado no cerrado, com solos menos férteis, que exigem maior investimento no manejo. A soja normalmente apresenta preços mais elevados em comparação ao milho, portanto, os produtores priorizam aplicações de insumos para esta cultura. No entanto, este cenário tem passado por mudanças desde que os preços do milho têm aumentado de forma constante (USDA, 2022). De acordo com a CONAB (2023b), a produtividade média na primeira safra 2022/2023 foi de 6.159,5 kg. ha⁻¹, já a segunda safra do mesmo ano obteve média de 5.948 kg. ha⁻¹.

No âmbito nacional, o interesse pela produção de etanol a partir do cereal incrementou as boas expectativas para o milho (USDA, 2022). De acordo com Nastari (2018), projeções que indicam a expansão da produção de etanol de milho no Brasil estão relacionadas ao crescimento acelerado da produção de milho. Estima-se que para a safra 2023/2024, a produção brasileira de etanol de milho deve alcançar 6 bilhões de litros, 36% a mais que no ciclo anterior e aumento de 800% nos últimos cinco anos (SENAR, 2023).

A previsão realizada pela USDA (2022) para a safra de 2022/2023 é que a disponibilidade de fertilizantes impactasse negativamente o Brasil, assim como o crescente custo de produção, com aumento estimado em 35% em relação à safra 2021/2022. O Brasil é o maior importador mundial de fertilizantes, com 85% de todos os nutrientes agrícolas adquiridos no exterior, sendo o milho responsável por consumir 17% do total de fertilizantes usados pelos produtores no Brasil (USDA, 2022).

2.2 MANCHA BRANCA DO MILHO

Pouca importância foi dada à mancha branca após os primeiros registros de ocorrência na cultura. De acordo com Cota et al. (2013), o milho foi considerado uma cultura rústica para a ocorrência de doenças, sendo o manejo anteriormente dispensado

por produtores e técnicos. A mudança no cenário sobre a importância de doenças em milho pode ter iniciado devido a uma severa epidemia de cercosporiose, ocorrida na safra dos anos 2000 no Estado de Goiás. Na época, a rotação de culturas era pouco empregada, e predominava na região o cultivo em sistema de plantio direto. Aliado a estes fatores, o uso de cultivares suscetíveis e condições ambientais favoráveis durante o período influenciaram na ocorrência severa da doença, acarretando em perdas de até 80% no rendimento da cultura (COTA et al., 2013).

O aumento da produção e do cultivo, a possibilidade de safras consecutivas e a presença de clima favorável são alguns dos fatores que contribuem para a crescente relevância de doenças em milho. As perspectivas em relação a incidência de doenças de milho são ainda mais relevantes, já que a prioridade do melhoramento genético tem sido a obtenção de materiais com elevada capacidade produtiva. Aliado a este fator, o sistema de produção contribui para a permanência de patógenos no campo (CASA, REIS, ZAMBOLIM, 2006; COTA et al., 2013).

Em meados dos anos 80, a mancha branca foi considerada uma doença de importância secundária, devido a que sua ocorrência no final do ciclo da cultura não causava grandes perdas de rendimento (CERVELATTI et al., 2002). O aumento da ocorrência e severidade da doença foram observados a partir dos anos 90. A partir de então, é considerada uma das principais doenças da cultura, sendo observada em estádios mais iniciais da cultura e encontrando-se presente em todas as regiões produtoras (BORSOI et al., 2018; FERNANDES; OLIVEIRA, 2000; PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001).

Em condições favoráveis a mancha branca pode diminuir o ciclo da planta devido à senescência foliar precoce. A diminuição da área foliar sadia causa perdas consideráveis na produtividade da cultura devido à redução da eficiência da fotossíntese. Severidades entre 10-20 % foram capazes de reduzir a fotossíntese em aproximadamente 40 %, ocasionando reduções equivalentes a 60 % na produção final da cultura (PINTO, 1999; GODOY et al., 2001).

2.2.1 Sintomatologia

Um dos sintomas característicos da doença é o surgimento inicialmente de lesões aquosas de coloração verde-oliva. As lesões evoluem para manchas necróticas de coloração palha (FANTIN, 1994; FERNANDES; OLIVEIRA, 2000). Geralmente se

caracterizam por formatos oblongo e irregulares, medindo entre 0,3 a 2,0 cm. As lesões podem coalescer e tornar-se de forma irregular (PARENTONI et al., 1994). De acordo com Paccola-Meirelles et al. (2002) o tamanho das lesões é dependente da resistência da planta à doença.

O progresso das lesões foi descrito por Paccola-Meirelles et al. (2001), em uma escala de 1 a 4, conforme Figura 1. O primeiro estágio corresponde ao surgimento de lesões do tipo anasarca com coloração verde oliva; no estágio 2 as manchas se tornam acinzentadas, no estágio 3 o avanço da doença se caracteriza por manchas necróticas sem estruturas reprodutivas fúngicas visíveis. O último estágio é representado por manchas necróticas com estruturas fúngicas visíveis.

Figura 1. Estágios 1, 2, 3 e 4 de lesões da mancha branca do milho causada pela bactéria *Pantoea ananatis*.



Foto: Fernanda N Paduan.

Os sintomas da mancha branca geralmente são encontrados dispersos no limbo foliar, mas iniciam-se da ponta para a base das folhas inferiores durante o período de floração. Os sintomas em folhas inferiores progridem rapidamente em direção à parte superior da planta, que se tornam mais graves após o pendoamento. A doença também foi observada em plantas mais jovens, com cerca de 40 dias, afetando suas folhas superiores e toda a planta, incluindo a espiga. Em condições favoráveis, a doença causa seca prematura da planta e sérios danos ao processo de enchimento dos grãos, com redução de

ciclo e diminuição no tamanho e peso dos grãos (SAWAZAKI et al., 1997; FERNANDES; OLIVEIRA 2000; COSTA et al., 2011).

2.2.2 Condições Para o Desenvolvimento da Mancha Branca do Milho

De acordo com Fantin (1994), a severidade da doença aumenta quando em condições de alta umidade relativa e temperaturas moderadas. O papel da temperatura e da água para a ocorrência da mancha branca também foram destacados por Fernandes et al. (1995) e Sawazaki et al. (1997) ressaltando que a doença é favorecida por temperaturas moderadas, em torno de 14 °C, e alta umidade relativa do ar associada a frequentes períodos de chuva.

Relatos indicam que temperaturas amenas determinam maiores severidades da mancha branca em milho, Fernandes et al. (1995), verificaram que em condições de baixas temperaturas (<14 °C) e umidade relativa (>60%) foram observados altos níveis de severidade. No entanto, em temperatura superior a 14 °C e umidade relativa abaixo de 60%, não foram observados sintomas da doença. Costa et al. (2013) também observaram o aumento da severidade da doença com o decréscimo da temperatura e condições de umidade relativa em torno de 75%, assim como Costa et al. (2011), que ressaltam que condições de temperaturas amenas (15 a 20°C) e elevada umidade relativa do ar (>60%) são favoráveis para o desenvolvimento da mancha branca. A precipitação acumulada foi ressaltada por Mesquini et al. (2020) como uma variável determinante para a ocorrência de doenças foliares em milho, entre elas, a mancha branca. Costa et al. (2013) demonstraram um aumento da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) com a diminuição da temperatura mínima média diária de duas épocas de plantio (19,44 °C e 17,42 °C, nas épocas 1 e 2 respectivamente), em que a umidade relativa média manteve-se em torno de 75%. Os autores atribuíram, portanto, o aumento da severidade decorrente da diminuição da temperatura média, uma vez que a umidade se manteve uniforme.

A prática de semeadura tardia de milho, realizadas a partir de novembro, permitem que a cultura se desenvolva sob altas precipitações, propiciando as condições adequadas para o desenvolvimento da doença (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997). Estas condições ocorrem com frequência durante o período de cultivo do milho em várias regiões do Brasil (FANTIN, 1994).

2.2.3 Manejo da Doença

De acordo com Cota et al. (2013) algumas medidas podem auxiliar na redução do inóculo inicial e nos danos causados por doenças de plantas. Os autores citam medidas como a utilização de cultivares resistentes; realização da semeadura em época adequada; utilização de sementes de boa qualidade; utilização da rotação com culturas não suscetíveis; rotação de cultivares; manejo adequado da lavoura com princípios gerais de controle de doenças.

O uso da resistência genética é uma alternativa viável para o manejo da mancha branca (SAWAZAKI et al., 1997; COSTA et al., 2013). A resistência à mancha branca é considerada uma característica quantitativa com alta herdabilidade, controlada por um número relativamente pequeno de genes com efeito aditivo e baixa interação genótipo x ambiente (CARSON et al. 2005; LOPES et al., 2007; LANA et al. 2017). Resultados demonstram a existência de fontes de resistência à doença no germoplasma de milho, como para os híbridos BRS1030 e BRS1035 (COSTA et al., 2011).

A época de semeadura também pode interferir na ocorrência da mancha branca. Segundo Fernandes e Oliveira (2000), as semeaduras realizadas a partir de novembro (tardia – safra de verão) permitem que a cultura se desenvolva sob condições adequadas para o desenvolvimento da doença, como a alta pluviosidade. Na semeadura, o cuidado com a utilização de sementes contaminadas com *P. ananatis* pode resultar na introdução do patógeno em campos de produção. De acordo com Mamede e Tebaldi (2020), a bactéria *P. ananatis* foi detectada em sementes de milho cinco genótipos, provenientes de plantas com sintomas de mancha branca.

Mesmo com o uso de cultivares resistentes e principalmente com cultivares suscetíveis ou com moderada resistência, a utilização de fungicidas tem sido uma medida bastante utilizada. Embora de etiologia bacteriana, o controle da mancha branca tem sido pouco eficiente com o uso de antibióticos. Segundo Romeiro (2005), embora possuam ação *in vitro*, fatores como a falta de resistência à chuva, baixa absorção e translocação na planta fazem com que o uso de antibióticos no campo não seja recomendado. Fungicidas do grupo químico das estrobilurinas foram responsáveis pela maior eficiência no controle da mancha branca do milho. Em contrapartida, fungicidas triazóis, benzimidazóis e cloreto de benzalcônio e os antibióticos oxitetraciclina e kasugamicina, apresentaram baixa ou intermediária eficiência no controle da doença em condição de campo (COSTA et al., 2012), assim como o uso de fungicidas protetores, como o mancozebe (FERNANDES, ROSA, LIMA, 2020).

2.2.4 Etiologia da Doença

A etiologia da mancha branca do milho foi motivo de controvérsia entre a comunidade científica. Desde o início dos relatos da doença no Brasil, a etiologia da doença foi associada ao fungo *Phaeosphaeria maydis*, tinha como base a sintomatologia da doença e descrições visuais de estruturas de reprodução sexuada e assexuada encontradas nas lesões, desconsiderando o isolamento e a identificação do patógeno e testes de patogenicidade ou postulados de Koch (FANTIN, 1994; SAWAZAKI et al., 1997). No entanto, a dificuldade do isolamento de *P. maydis* e a falta da reprodução de sintomas da doença com sua inoculação mesmo em condições controladas, fizeram com que a etiologia fosse questionada (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; CERVELATTI et al., 2002). Os fungos *Phoma sorghina*, *Phoma* sp., *Phyllosticta* spp., e *Sporormiella* sp. foram apontados por Amaral et al. (2005) como agentes etiológicos da mancha branca. Entretanto, o isolamento de cada uma dessas espécies foi restrita a uma condição ambiental específica e variou de acordo com as regiões e estações do ano.

Em 2001 foi relatada a presença da bactéria *Pantoea ananatis* em lesões jovens da mancha branca, sugerida como agente causador da doença (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). Plantas inoculadas com *P. ananatis* sob condições controladas manifestaram os sintomas típicos da doença entre 5 a 7 dias após a inoculação.

Estudos com microscopia eletrônica de transmissão realizados por Bomfeti et al. (2008) identificaram um grande número de células bacterianas nos espaços intercelulares de lesões de mancha branca. Os autores não observaram a presença de estruturas fúngicas em lesões jovens. A realização da técnica de PCR em lesões jovens resultou em amplificação positiva com *primers* bacterianos. Nenhuma amplificação foi observada para *primers* fúngicos em lesões iniciais, com resultados positivos foram encontrados apenas em lesões mais velhas. Gonçalves et al. (2013) também observaram a presença da bactéria desde o início dos sintomas. Os autores concluíram que *P. ananatis* seria o patógeno primário da doença e a presença de espécies fúngicas seria devido à posterior colonização.

2.3 *Pantoea ananatis*

Inicialmente descrita como *Erwinia ananas* (SERRANO, 1928), a classificação da bactéria foi modificada para *Pantoea ananas* (MERGAERT et al., 1993), e definida

posteriormente para *Pantoea ananatis* (TRÜPER; DE'CLARI, 1997). Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, com colônias de coloração amarelo brilhante, bordos regulares, não esporulante, anaeróbica facultativa. Pertence à família Enterobacteriaceae no grupo Gammaproteobacteria, apresentando um cromossomo e um plasmídeo (CHOI et al., 2012; DE MAAYER et al., 2010).

P. ananatis pode ser observada epifiticamente em plantas, sem estar associada a uma doença. No entanto, estas plantas podem atuar como fonte de inóculo e desta forma propiciar a ocorrência de surtos de doenças em hospedeiros suscetíveis cultivados nas proximidades. Quanto à patogenicidade em plantas, *P. ananatis* têm sido reportada como emergente agente etiológico de doenças em 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). *P. ananatis* também foi reportada causando doenças na cultura do arroz (MONDAL et al., 2011; XUE et al., 2021), trigo (KRAWCZYK et al., 2020), cebola (GOSZCZYNSKA et al., 2006; CARR et al., 2010), melão (KIDO et al., 2008), eucalipto (DE MAAYER, et al., 2010) e morango (ABDEL-GAIED et al., 2022).

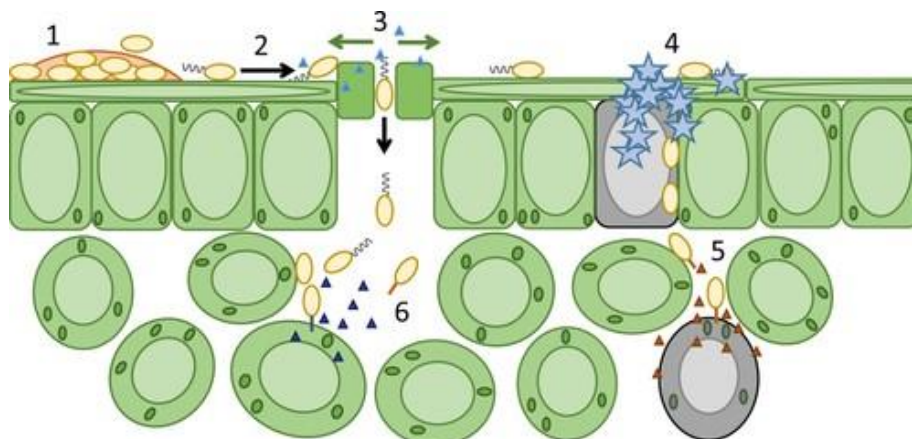
Embora esta bactéria seja capaz de causar doenças, também tem sido relatada atividades promotoras de crescimento em plantas com mecanismos de produção de sideróforos, auxinas (ácido indol-acético) e celulase (KIM et al., 2012a; SILVA, et al., 2015; MEGIAS et. Al., 2017; LU et al., 2021) e antagonistas a outros fitopatógenos (GASSER et al., 2014). A versatilidade de *P. ananatis* pode estar associada à ampla variabilidade genética encontrada entre isolados e, por esse motivo, estudos voltados ao entendimento dos mecanismos de patogenicidade são cada vez mais relevantes.

2.3.1 Patogênese Bacteriana

De acordo com Pfeilmeier, Caly e Malone (2016), o processo de infecção de uma bactéria em planta não é simples. Em contato com o hospedeiro, bactérias devem primeiro sobreviver na superfície epifítica o tempo suficiente para iniciar uma infecção. Após a sobrevivência epifítica, os fitopatógenos devem migrar para o tecido vegetal por movimentação e/ou quimiotaxia. Essa migração está associada à superação das barreiras físicas e químicas de entrada no apoplasto da planta. Uma vez dentro da planta, as

bactérias usam uma série de sistemas de secreção para liberar fitotoxinas e efetores proteicos que cumprem diversas funções patogênicas (Figura 2).

Figura 2. O processo de infecção de bactérias em plantas. 1. Sobrevivência epifítica e formação de biofilme. 2. Migração impulsionada por flagelos/pili através das superfícies das plantas para locais de entrada apoplástica. 3. Liberação de fitotoxinas para contornar o fechamento estomático. 4. Nucleação de gelo para danificar as superfícies das plantas. 5. Secreção de enzimas extracelulares para degradar as paredes celulares e permitir a entrada do patógeno no tecido vegetal. 6. Secreção de fitotoxinas para modificar a fisiologia, o metabolismo e as respostas de defesa das plantas.



Fonte: Adaptado de Pfeilmeier, Caly e Malone (2016).

2.3.1.1 Aclimação ao choque térmico frio

Bactérias epifíticas frequentemente estão expostas à dessecação, radiação ultravioleta, alterações adversas de temperatura e perturbações mecânicas. As respostas metabólicas ao frio e ao choque osmótico, bem como à dessecação e ao estresse contribuem para a sobrevivência epifítica (PFEILMEIER, CALY, MALONE, 2016).

A bactéria *P. ananatis*, pertencente ao grupo das psicrotróficas, termo recomendado para qualquer microrganismo capaz de crescer sob temperaturas iguais ou menores que 7°C, independente de qual seja a temperatura ideal (THOMAS; THOMAS, 1973; MORITA, 1975), apresenta crescimento em temperaturas de 4 e 30 °C (SUMAN et al., 2020), com crescimento ideal entre 25 e 37 °C. A compreensão dos mecanismos pelos quais as bactérias se adaptam ao frio ainda é desconhecido. No entanto, o crescimento e a multiplicação celular nessas temperaturas indicam que essas bactérias desenvolveram estratégias adaptativas para manter a atividade enzimática e a funcionalidade da membrana (HÉBRAUD, M. et al, 1999).

Rowbury (2003) cita que uma das adaptações ocorre na membrana plasmática, que atua como interface entre os ambientes externo e interno da célula e pode ser um dos

principais sensores de frio. Quando expostas a temperaturas baixas, ocorre uma diminuição na fluidez da membrana, o que prejudica as funções de transporte, geração de energia e divisão celular (VIGH et al., 1993). Ao mesmo tempo, a rigidez da membrana ativa uma proteína sensora, que emite um sinal primário para a percepção ao frio. A sobrevivência à baixa temperatura depende da capacidade do sensor de perceber e traduzir o sinal para o genoma bacteriano, provocando a regulação positiva de genes cujos produtos provavelmente estarão envolvidos na adaptação ao frio. Para se adaptar à baixa temperatura, ocorre a restauração da função da membrana, aumentando a fluidez através de estratégias como a alteração do tamanho e a carga dos grupos hidrofílicos e a proporção de ácidos graxos de cadeia curta e longa (SHIVAJI; PRAKASH, 2010; MANSILLA; MENDOZA, 2019).

Outro aspecto da adaptação ao frio diz respeito à síntese de um conjunto específico de proteínas que não são presentes em temperaturas mais amenas. Esta particular classe de proteínas, conhecidas como proteínas de aclimação ao frio (*Caps*), é sintetizado durante crescimento em baixa temperatura. Tais proteínas foram descritas em uma variedade de bactérias adaptadas ao frio filogeneticamente não relacionadas (ARAKI, 1992; ROBERTS; INNIS, 1992; WHYTE; INNIS, 1992; HEBRAUD et al., 1994; BERGER et al., 1996). A presença de *Caps* parece ser uma característica geral de bactérias adaptadas ao frio, que os diferenciam dos microrganismos mesofílicos.

As proteínas induzidas por choque frio desempenham papel importante nesses mecanismos de superação da redução da temperatura (HÉBRAUD, M. et al, 1999). De acordo com Hébraud et al. (1999), as proteínas de choque frio (*Csps*) são super expressas após uma queda brusca de temperatura, e a magnitude de sua indução depende da faixa de mudança de temperatura. Estas proteínas podem estar envolvidas em importantes processos metabólicos em baixa temperatura, mantendo a fluidez da membrana e/ou substituindo peptídeos desnaturados a frio, cujo acúmulo seria deletério para as células.

Segundo Weber e Marahiel (2003), a análise da expressão genética dependente da temperatura é essencial para compreender diversas funções celulares e sobretudo a patogenicidade bacteriana. A produção de fatores de virulência bacteriana necessários para interagir e/ou invadir uma célula hospedeira é controlada pela temperatura (KONKEL; TILLY, 2000). Muitos patógenos de plantas como *Erwinia* e *Pseudomonas* demonstraram ativar a expressão do fator de virulência em exposição à baixa temperatura. Dentre os determinantes de virulência expressos, constaram àqueles relacionados à transferência de genes de bactérias para plantas, enzimas que degradam a

parede celular das plantas, fitotoxinas, atividade de nucleação de gelo, produção de exopolissacarídeos e a sistema de secreção tipo III (SMIRNOVA et al., 2001).

2.3.1.2 Biofilme

Biofilmes são compostos por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que cobre e protege as bactérias em comunidade. A formação de biofilme aumenta a resistência à diminuição de nutrientes, mudanças no pH e atua contra o sistema de defesa do hospedeiro ou antibióticos, além de aumentar a fixação na superfície do hospedeiro. Segundo Jeong et al., (2014), a baixa temperatura é um dos fatores que afetam a síntese de EPS.

De acordo com Wu et al. (2012), a adição de EPS aumentou a sobrevivência de bactérias em 1000 a 10000 vezes quando expostas ao congelamento e descongelamento. Uma mutação em cepa de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* resultou em comprometimento do desenvolvimento estrutural do biofilme, perda de quimiotaxia e redução da virulência em toranjas (YARYURA et al., 2015). Além da proteção, o EPS influencia na patogenicidade através da produção de toxinas (DENNY, 1995).

2.3.1.3 Motilidade

Uma vez em condições que permitam a entrada no hospedeiro, bactérias utilizam vários sistemas de motilidade para migrarem pela superfície da folha para locais de acesso ao interior da planta. A motilidade impulsionada pelos flagelos confere vantagens de aptidão epifítica em *P. syringae* (HAEFELE; LINDOW, 1987), e é altamente importante para a colonização de superfícies e virulência eficaz das plantas (TANS- KERSTEN et al., 2001).

A motilidade de *P. ananatis* também interfere diretamente na severidade de doenças. A capacidade de se espalharem na superfície ou em espaços intercelulares se deve a utilização de flagelos, estruturas especializadas para a motilidade natatória, mas que são considerados fatores de virulência, desempenhando também função de adesão (HAIKO; WESTERLUND- WIKSTRÖM, 2013). De acordo com Weller-Stuart et al. (2016), a motilidade de bactérias fitopatogênicas podem ser através da rotação de flagelos ou pela contração de pilis. Os autores observaram que uma cepa mutante de *P. ananatis* com a deleção do gene *flgK*, responsável pela formação do flagelo, resultou em células não flageladas, enquanto a deleção do gene *motA*, que codifica para proteína responsável

pela rotação flagelar, foi flagelado, mas não móvel. A ausência dos genes *flgK* e *motA* fizeram com que a cepa de *P. ananatis* perdesse a capacidade de causar sintomas em folhas de cebola, segundo os autores, devido à incapacidade de se fixar à planta hospedeira e/ou mover-se para o local da infecção.

2.3.1.4 *Quorum sensing*

O processo que define se as bactérias permanecerão na superfície das folhas ou invadirão o interior do hospedeiro é crucial para o início e a continuidade das infecções em plantas. As bactérias possuem a capacidade de agir coletivamente, e, comportamentos coordenados incluem a produção de fatores de virulência. Em grande parte, este processo é mediado por vias de sinalização baseadas em moléculas. O mecanismo de *quorum sensing* (QS) é utilizado para a comunicação entre bactérias e para avaliar a densidade celular através de moléculas sinalizadoras, chamadas autoindutoras. Moléculas autoindutoras são detectadas pelas bactérias no ambiente e afetam a expressão gênica quando um nível limite, que reflete uma densidade celular crítica, é atingido. Estes sistemas regulam a motilidade e a formação de biofilme, a expressão de genes de virulência e a comunicação com outras bactérias (PFEILMEIER; CALY; MALONE, 2016).

A detecção de quórum permite que grupos de bactérias alterem o comportamento de forma síncrona em resposta à mudanças na densidade populacional (MUKHERJEE; BASSLER, 2019). Em *P. ananatis* isolada de plantas de milho, identificou-se a molécula acil-homoserine-lactona (AHL) como sinalizadora do *quorum sensing* (POMINI et al., 2007). As moléculas de AHLs são sintetizadas e difundidas tanto dentro quanto fora das células bacterianas, resultando no aumento da concentração e acúmulo de AHL no meio. Essas moléculas se ligam a uma proteína receptora, regulando a expressão de diversos genes responsáveis por processos como simbiose, conjugação, produção de antibióticos, motilidade e patogenicidade (PEARSON et al., 1994; MILLER; BASSLER, 2001). O sistema regulador, portanto, é formado por uma molécula autoindutora de AHL (I) e uma molécula receptora (R). Existem três sistemas reguladores do QS descritos para *Pantoea ananatis*, LuxI/LuxR, EanI/R e RhII/R.

Morohoshi et al. (2007) observaram que a inativação do sistema de QS EanI/R, gene indutor de AHL (*eanI*), em cepa de *P. ananatis* causou interrupção da biossíntese de exopolissacarídeos, formação de biofilme e infecção de folhas de cebola. O sistema

EanI/R de *P. ananatis* foi descrito como responsável pela regulação de vários genes, incluindo aqueles que codificam para a formação de flagelos, motilidade dependente de flagelos, adesão celular, formação de biofilme, transporte, quimiotaxia, proteínas de membrana, síntese de parede celular, resposta ao estresse e um grande número de proteínas hipotéticas (SIBANDA et al., 2018).

Um estudo realizado por Tabraiz et al. (2021) demonstra que a queda de temperatura pode influenciar a produção, excreção e atividade das moléculas de AHL envolvidas no *quorum sensing*, afetando a comunicação e o comportamento social das comunidades microbianas em biorreatores de membrana anaeróbica. Em biorreatores anaeróbicos, a baixa temperatura aumentou a atividade do *quorum sensing*, devido a estresse ambiental, competição entre espécies e fome bacteriana.

2.3.1.5 Sistema de Secreção Tipo VI

Como parte do processo infeccioso, bactérias são capazes de liberar compostos tóxicos, metabólitos secundários e antimetabólitos quando em contato com o hospedeiro, a fim de inibir ou inativar compostos de defesa do hospedeiro. Bactérias Gram-negativas utilizam sistemas de secreção, classificados em tipos I, II, III, IV, V e IV (KADO, 2010).

Cepas fitopatogênicas de *P. ananatis* utilizam um Sistema de Secreção Tipo VI (T6SS) tanto para a virulência em plantas de cebola quanto para competição bacteriana intra e interespecies (SHYNTUM et al., 2015). Shyntum et al. (2014) identificaram três diferentes loci do T6SS em *P. ananatis*, denominados T6SS-1, T6SS-2 e T6SS-3, sendo o T6SS-2 presente em apenas algumas cepas. Os autores citam que os três agrupamentos de T6SS parecem ter sido adquiridos independentemente e podem desempenhar papéis diferentes relacionados à patogenicidade, determinação da gama de hospedeiros e/ou adaptação de nicho. Essa hipótese foi confirmada por Shyntum et al. (2015), onde a deleção do agrupamento T6SS-1 fez com que uma cepa patogênica de *P. ananatis* perdesse a capacidade de causar doença em folhas de cebola. Esses resultados indicam que o *cluster* de genes *T6SS-1* provavelmente codifica um T6SS funcional que tem um papel essencial na patogenicidade.

2.3.1.6 Nucleação de gelo e proteína *omptin*

Além da entrada por aberturas naturais, as bactérias fitopatogênicas podem adentrar no apoplasto através de feridas na epiderme do hospedeiro. Muitos patógenos

produzem enzimas e outras proteínas que danificam a parede celular e assim permitem a entrada no tecido vegetal (PFEILMEIER; CALY; MALONE, 2016).

P. ananatis é uma das poucas espécies de bactérias que demonstram a capacidade de nucleação de gelo (ABE et al., 1989; OBATA et al., 1990), sendo apontado por autores como um dos fatores relacionados à patogenicidade e no desenvolvimento da doença mancha branca do milho (ROCHA et al., 2019). O fenômeno de nucleação de gelo por bactérias possibilita a formação de cristais de gelo na água, em temperaturas ligeiramente mais altas do que normalmente ocorreria (SAUER et al., 2014, SAUER et al., 2015).

Em condições ambientais favoráveis, a presença de bactérias nucleadoras de gelo podem fazer com que as plantas se tornem mais suscetíveis a danos por congelamento, iniciando-se a formação de gelo, que é necessário para danos causados pela geada (LINDOW, ARNY, UPPER, 1978a; LINDOW, 1983). Injúrias causadas por geadas a -5 °C em campos de cultivo de milho foram proporcionais ao logaritmo das populações de bactérias INA nas folhas (LINDOW, ARNY, UPPER, 1978a; LINDOW 1982). A geada é um fenômeno frequente no estado do Paraná durante o outono-inverno, com maior ocorrência nos meses de junho e julho (GUETTER, ZAICOVSKI, 2000; KIM, et al., 2003), coincidindo com a época de cultivo do milho safrinha. Os danos da geada causados pela nucleação de gelo induzida por bactérias INA+ facilitam a entrada de patógenos no tecido vegetal. Além disso, mesmo o estresse indireto causado em plantas pela queda de temperatura pode influenciar danos subsequentes por patógenos (LINDOW; ARNY; UPPER, 1982).

Para superar as defesas da superfície foliar da planta, bactérias podem produzir moléculas que facilitem a entrada no hospedeiro, como as proteases. As omptinas são uma família de proteases da membrana externa que foram identificadas em todas as principais espécies de enterobactérias patogênicas para humanos ou plantas (HAIKO et al., 2011). As omptinas são multifuncionais e exibem diferentes funções associadas à virulência, funcionando como proteases, adesinas ou invasinas. Estas proteases bacterianas contribuem para a virulência ao inativar proteínas de defesa do hospedeiro, para a destruição de tecidos e aumentam a migração bacteriana através das barreiras teciduais (BRANNON et al., 2015). Para *Erwinia amylovora*, a proteína *omptin* foi mais expressa em cepas mais virulentas, o que contribuiu para a aptidão geral desta estirpe e na superação dos mecanismos de defesa das plantas (HOLTAPPELS; NOBEN; VALCKE, 2016).

3 ARTIGO A: BAIXAS TEMPERATURAS REGULAM A DENSIDADE POPULACIONAL E AUMENTAM A EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Pantoea ananatis* EM MILHO

3.1 RESUMO: Causada pela bactéria *Pantoea ananatis* e uma das principais doenças do milho, a doença mancha branca pode se tornar mais severa em temperaturas baixas. Este estudo teve como objetivo investigar a dinâmica populacional e expressão de genes relacionados à patogenicidade de *P. ananatis*, agente causal da mancha branca do milho, em resposta a choque térmico com diminuição de temperatura. Trinta isolados bacterianos foram coletados e caracterizados quanto à presença do gene de nucleação de gelo, *inaA*, e sua influência na patogenicidade da bactéria. Testes de patogenicidade revelaram que alguns isolados, mesmo apresentando o gene *inaA*, não causaram sintomas em milho ou tabaco. A dinâmica populacional in vitro demonstrou em plantas sob choque térmico a população bacteriana aumentou entre 100 e 119%. A queda de temperatura intensificou as lesões em milho, ressaltando seu papel na patogenicidade de *P. ananatis*. A expressão dos genes *hmsP* e *cspD* foi mais intensa em plantas expostas a choques térmicos, evidenciando maior formação de biofilme e produção de proteínas relacionados a choque com frio. Genes relacionados à motilidade bacteriana, como *motA* e *fliM*, também foram regulados positivamente em plantas sob choque com frio. O gene relacionado ao Sistema de Secreção Tipo VI (T6SS) foi induzido sob choque frio, principalmente 48 horas após a inoculação. A redução de temperatura não afetou a expressão do gene de *quorum sensing*. Essas observações evidenciam o impacto das baixas temperaturas na dinâmica populacional, severidade de lesões, virulência e genes relacionados à formação de biofilme, a produção de proteínas de choque frio, motilidade bacteriana e T6SS de *P. ananatis*. O estudo reforça a importância de considerar as condições térmicas no manejo da mancha branca do milho, contribuindo para estratégias eficazes de controle e compreensão mais aprofundada da interação patógeno-planta.

Palavras-chave: Choque térmico. Mancha branca do milho. Motilidade bacteriana. Patogenicidade.

3.2 ABSTRACT: Caused by the bacterium *Pantoea ananatis* and one of the main diseases of maize, the white spot can become more severe in low temperature. This study aimed to investigate the population dynamics and the expression of genes related to the pathogenicity of *P. ananatis*, the causal agent of maize white spot, in response to thermal shock with temperature decrease. Thirty bacterial isolates were collected and characterized for the presence of the ice nucleation gene, *inaA*, and its influence on bacterial pathogenicity. Pathogenicity tests revealed that some isolates, even with *inaA* in their genome, did not cause symptoms in maize or tobacco. In vitro population dynamics showed that thermal variations significantly impacted bacterial growth, as well as in plants under thermal shock, where the bacterial population increased between 100 and 119%. The temperature drops intensified lesions in maize, highlighting its role in the pathogenicity of *P. ananatis*. The expression of *hmsP* and *cspD* genes was more intense in plants exposed to thermal shocks, indicating higher biofilm formation and production of cold shock-related proteins. Genes related to bacterial motility, such as *motA* and *fliM*, were also positively regulated in plants under cold shock. The gene related to Type VI Secretion System (*T6SS*) was induced under cold shock, mainly 48 hours after inoculation. The temperature reduction did not affect the expression of the quorum sensing gene. These observations demonstrated the considerable impact of low temperature on population dynamics, lesion severity, virulence, and genes related to the increased pathogenic potential of *P. ananatis*. The study reinforces the importance of considering thermal conditions in the management of maize white spot disease, contributing to effective control strategies and a deeper understanding of the pathogen-plant interaction.

Key-words: Bacterial motility. Cold shock. Maize white spot disease. Pathogenicity.

3.3 INTRODUÇÃO

A mancha branca, doença inicialmente considerada de importância secundária do milho no Brasil, ganhou destaque nas últimas décadas tornando-se uma das principais doenças da cultura (CASA, REIS, ZAMBOLIM, 2006; COTA et al., 2013). Condições climáticas, como alta umidade relativa e temperaturas amenas, desempenham papéis relevantes na ocorrência da mancha branca (FANTIN, 1994; COSTA et al., 2011; MESQUINI et al., 2020).

A verificação dos postulados de Koch e a presença da *Pantoea ananatis* em lesões jovens da mancha branca, assim como a reprodutibilidade de sintomas permitiram que esta bactéria fosse considerada como o agente etiológico da mancha branca do milho (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; KIM et al., 2012a; MEGIAS et al., 2017). *P. ananatis* é uma bactéria frequentemente observada em colonização epifítica em plantas, mas também é considerada um importante agente etiológico emergente de doenças em diversas culturas, como arroz (MONDAL et al., 2011; XUE et al., 2021), trigo (KRAWCZYK et al., 2020), cebola (GOSZCZYNSKA et al., 2006; CARR et al., 2010), melão (KIDO et al., 2008), eucalipto (DE MAYER, et al., 2010) e morango (ABDEL-GAIED et al., 2022).

De acordo com Rocha et al. (2019), o aumento da população da bactéria é crucial para que ocorra a doença em milho. Apesar de sua capacidade patogênica, *P. ananatis* também exibe atividades promotoras de crescimento em plantas (MEGIAS et al., 2017; LU et al., 2021), além de atuar como antagonista a outros fitopatógenos, como *Botrytis cinerea* (GASSER et al., 2012) e *Penicillium expansum* (TORRES et al., 2015). A notável versatilidade dessa bactéria pode ser atribuída à sua ampla variabilidade genética, destacando a importância de estudos aprofundados para compreender os mecanismos de patogenicidade.

A infecção bacteriana em plantas é um processo complexo (PFEILMEIER, CALY, MALONE, 2016). As bactérias devem inicialmente se adaptar à superfície epifítica, sobreviver e, em seguida, migrar para o tecido vegetal, superando barreiras físicas e químicas. Uma vez dentro do hospedeiro, as células bacterianas utilizam sistemas de secreção para liberar fitotoxinas e efetores proteicos, desencadeando funções patogênicas. Genes envolvidos na motilidade (WELLER-STUART et al., 2016), *quorum sensing* (SIBANDA et al., 2018) e Sistema de Secreção Tipo VI (SHYNTUM et al., 2015) foram relatados como essenciais para a virulência de *P. ananatis*. Em condições de estresse relacionadas à temperatura, proteínas de choque frio desempenham papel na sobrevivência, adaptação e na regulação da expressão de genes de virulência em bactérias (GRAUMANN et al., 1997).

O crescimento e sobrevivência de *P. ananatis* foi observado em baixas temperaturas (TORRES et al., 2005). Segundo Smirnova (2001), certas bactérias fitopatogênicas, embora apresentem maior crescimento em faixas de temperatura ideais entre 25 e 30 °C, demonstram aumento na expressão de genes de virulência quando expostas à temperaturas mais baixas, variando de 16 a 24 °C. Konkel e Tily (2000)

também mencionam a regulação de genes de virulência pela temperatura, fazendo a associação com um interruptor "liga-desliga", atuando de maneira distinta na resposta geral ao choque térmico.

A compreensão da influência ambiental nas expressões gênicas do patógeno é crucial para o entendimento da epidemiologia da mancha branca do milho. Este estudo teve como objetivos i) caracterizar isolados de *P. ananatis* quanto à presença do gene de nucleação de gelo ii) determinar o impacto do gene *inaA* na patogenicidade; iii) avaliar se a temperatura influencia a dinâmica populacional da bactéria *in vitro* e *in planta*, a severidade das lesões em milho e a expressão de genes de virulência.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Isolamento de *Pantoea ananatis*

Foram coletadas folhas de milho com sintomas típicos de mancha branca em Londrina - PR, Naviraí - MS, Eldorado – MS e Chapadão do Sul – MS (Tabela 1). Os isolados UFU B13 e UFU E43 foram provenientes da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

Tabela 1. Identificação, origem e ano de isolamento de *Pantoea ananatis* em milho com sintomas de mancha branca utilizados neste estudo.

Número	Identificação	Local de coleta	Ano de isolamento
1	UFU UFU B13	Planaltina de Goiás-GO	2010
2	UFU E43	Uberlândia-MG	2010
3	MS1.1	Naviraí - MS	2020
4	MS1.2	Naviraí - MS	2021
5	MS1.3	Naviraí - MS	2021
6	MS1.4	Naviraí - MS	2021
7	MS1.5	Naviraí - MS	2021
8	MS2.1	Eldorado - MS	2021
9	MS2.2	Eldorado - MS	2021
10	MS2.3	Eldorado - MS	2021
11	MS2.4	Eldorado - MS	2021
12	MS2.5	Eldorado - MS	2021
13	MS2.6	Eldorado - MS	2021
14	MS2.7	Eldorado - MS	2021
15	Fazesc1	Londrina - PR	2022
16	Fazesc2	Londrina - PR	2022
17	Fazesc3	Londrina - PR	2022
18	Fazesc4	Londrina - PR	2022
19	F1.1	Londrina - PR	2022
20	F1.2	Londrina - PR	2022
21	F2.1	Londrina - PR	2022
22	F2.2	Londrina - PR	2022
23	MS3.1	Londrina - PR	2022
24	F3.2	Londrina - PR	2022
25	F4.1	Londrina - PR	2022
26	F5.1	Londrina - PR	2022
27	F6.1	Londrina - PR	2022
28	F6.3	Londrina - PR	2022
29	F7.2	Londrina - PR	2022

O isolamento do patógeno seguiu metodologia proposta por Paccola-Meirelles et al. (2001). Folhas de milho com lesões iniciais da doença (estágios 1 e 2) foram cortadas com bisturi estéril, tratadas com álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio 2% (4 min), álcool 70% (30 segundos) e lavadas três vezes por 30 segundos em água esterilizada. As extremidades das seções foliares foram transferidas para meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) suplementado com ciclohexamida ($50 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de meio de cultura).

3.4.2 Identificação e Caracterização Molecular dos Isolados

Para identificação da espécie e presença do gene *inaA*, as bactérias foram crescidas em meio TSB a 30 °C sob agitação de 60 rpm por 24 horas. Para a extração do DNA de cada isolado, 1 mL da cultura foi centrifugada a 14.000 rpm e o *pellet* submetido ao protocolo de Ausubel et al. (1992), com modificações. A qualidade e integridade do DNA extraído foram observadas em gel de agarose e quantificados em NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*).

Para caracterização dos isolados, foram utilizados *primers* específicos para *P. ananatis* conforme metodologia descrita por Figueiredo e Paccola-Meirelles (2012). A identificação do gene *inaA* foi realizada com *primers* e metodologia de acordo com Nejad et al. (2006), apresentados na Tabela 2. Para a amplificação de ambos fragmentos, foi utilizado kit *Dream Taq® Green Master Mix* (Thermo Scientific). A reação foi composta de 3 μL de DNA ($30 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) de cada isolado, 1 μL de *primer* direto (10 nM), 1 μL de *primer* reverso (10 nM) 12,5 μL de Taq DNA Polymerase e 7,5 μL de água livre de nucleases. Os reagentes foram combinados e mantidos em termociclador Applied Biosystems Veriti 96, com programação inicial de 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 15 segundos, 72 °C por 8 segundos, e finalizada a 72 °C por 10 minutos. Ao término da programação, as amostras foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% e brometo de etídeo a 1%, para confirmar a avaliação de presença de bandas. Os géis foram visualizados sob luz ultra-violeta e fotografados com sistema de foto documentação (L-PIX, Loccus).

Tabela 2. *Primers* usados para identificação de isolados de *Pantoea ananatis* de milho e para detecção da presença do gene *inaA* por PCR.

Gene	Primer e sequencia	Amplicon (pb)	Referência
16-23S rRNA	PANA_F_PCR: CGTGAAACTACCCGTGTCTGTTGC	360-380	Figueiredo e Paccola-Meirelles, 2012
	PANA_R_PCR: TGCCAGGGCATCCACCGTG TACGCT		
<i>inaA</i>	INAA_F_PCR: AGGCTTTGAGAACGGACTAACG	350-400	Nejad et al., 2006
	INAA_R_PCR: TTTCTGTCTGGCTGCGTACTG		

3.4.3 Teste De Patogenicidade

Sementes de milho do híbrido suscetível Fórmula (Syngenta) foram semeados em vasos plásticos de 180 mL contendo substrato comercial (All Garden) e mantidos em casa de vegetação. Foram cultivadas três plantas por vaso, as quais foram submetidas à câmara úmida em estufa do tipo BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12h pelo período de 24h aos 9 dias após a emergência (estádio fenológico V4). As plantas foram retiradas da câmara úmida e as folhas foram secas com papel toalha para retirar o excesso de umidade.

Todos os isolados bacterianos foram cultivados em meio TSA (*Tryptic Soy Agar*, Kasvi) por 24 h. A suspensão foi preparada por diluição do crescimento bacteriano em água destilada autoclavada, calibrados em espectrofotômetro em $OD_{600} = 0,5$ ($7,48 \cdot 10^{13}$ UFC). A suspensão bacteriana foi infiltrada nas folhas de milho com auxílio de seringa sem agulha e armazenadas em câmara de crescimento do tipo BOD a 25 °C e 15 °C, alternados a cada 12h, e fotoperíodo de 12h. Como testemunha, as plantas foram infiltradas com água destilada autoclavada. Após a inoculação, as plantas foram envoltas com saco plástico transparente, previamente borrifados com água em seu interior, mantidos por 24 h. Após sete dias da inoculação, as plantas foram verificadas quanto ao aparecimento de lesões necróticas.

Foi realizado um teste de resposta de hipersensibilidade em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). As suspensões bacterianas, obtidas conforme descrito anteriormente, foram calibradas para aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹ ($OD_{600} = 1,0\sim 1,1$). A suspensão foi infiltrada em folhas de tabaco (cv. Xanthi), como descrito por Klement (1963), com auxílio de seringa sem agulha. O tabaco foi cultivado em casa de vegetação e, após a infiltração, mantido por 2 dias em câmara de crescimento a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após 48 h, a indução da reação de hipersensibilidade (reação necrótica) pelos

isolados no local da infiltração indica um isolado bacteriano fitopatogênico. Segundo Umesha et al. (2008) e Klement e Goodman (1967), plantas de tabaco são as mais adequadas para investigações de resposta hipersensível, sendo possível diferenciar rapidamente bactérias fitopatogênicas de saprófitas.

3.4.4 Temperaturas Na Dinâmica Populacional De *Pantoea ananatis* in vitro

O isolado UFU B13 foi cultivado por 24 horas em placas de Petri com meio de cultura TSA. Uma única colônia foi transferida para tubos Falcon com 5 mL de meio de cultura TSB (*Tryptic Soy Broth*, Kasvi) e incubados a 28 °C até o momento de iniciar os tratamentos térmicos, descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Tratamentos térmicos para avaliação da densidade populacional de *Pantoea ananatis* isolado UFU B13

Tratamentos	
T1	28 °C por 24 horas
T2	28 °C por 20h e 15°C por 4 horas
T3	28 °C por 23h50 e 15 °C por 10 minutos
T4	28 °C por 23h50 e 4 °C por 10 minutos
T5	28 °C por 23h50 e 0 °C por 10 minutos

Para o tratamento de 4 °C (T4) e 0 °C (T5), as culturas em tubo Falcon foram inseridas em recipiente de isopor com gelo, água e sal. Um termômetro foi utilizado em outro recipiente idêntico e sob as mesmas condições para monitorar e controlar a temperatura, enquanto o tempo foi registrado. Já o tratamento de 15°C foi conduzido em B.O.D., ajustada para manter essa temperatura de forma controlada. Após realizado os choques térmicos, os tubos foram removidos das condições e mantidos a temperatura ambiente até o momento das demais análises. Foram realizadas 5 repetições, sendo a unidade experimental constituída por um tubo.

Foram realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda a 600 nm. Adicionalmente à absorbância, foi realizada a contagem de células viáveis pela técnica de microgota. Para isso, foram realizadas diluições seriadas (1:10) das suspensões bacterianas em solução salina 0,85%. Da diluição 10⁻⁷ foram retiradas

cinco alíquotas de 10 µL, depositadas em placas de Petri contendo meio de cultura TSA e incubadas a 28 °C por 24 h. A avaliação determinou o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) ml⁻¹.

A quantificação de bactérias por absorbância e por número de células viáveis foi realizada em delineamento inteiramente casualizado. Para a leitura de absorbância foram realizados cinco tratamentos com cinco repetições. Para a contagem do número de UFC, foram utilizados os mesmos cinco tratamentos, com vinte e cinco repetições. Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias de Bartlett e normalidade dos erros de Shapiro-Wilk, seguidos de análise de variância e teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.4.5 Temperaturas Na Densidade Populacional De *Pantoea ananatis* em Milho

Plantas de milho do híbrido suscetível Fórmula (Syngenta®) foram cultivadas em vasos de 180 mL utilizando substrato comercial (All Garden) mantidos em casa de vegetação até os nove dias após a emergência (estádio fenológico V4). Cada vaso continha três plantas, as quais foram expostas à câmara úmida a 25 °C em estufa B.O.D. com fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas, as plantas foram removidas da câmara úmida. As folhas foram cuidadosamente secas com papel toalha para remover o excesso de umidade.

Após o período de câmara úmida, as plantas foram pulverizadas com suspensão bacteriana do isolado de *P. ananatis* UFU B13. Para preparar a suspensão, a bactéria foi cultivada em meio TSA por 24 horas e o crescimento bacteriano foi diluído em água destilada autoclavada, ajustando-se a densidade óptica para OD₆₀₀ = 0,5 (7,48 .10¹³ UFC. mL⁻¹). Em seguida, a suspensão bacteriana foi pulverizada sob a superfície das folhas das plantas, até o completo molhamento foliar e evitando o escorrimento.

As plantas foram submetidas aos tratamentos térmicos em uma câmara de crescimento do tipo B.O.D. Os tratamentos consistiram em dois regimes térmicos: 25 °C e 15 °C, alternando-se a cada 12 horas e 25 °C contínuos, ambos com um fotoperíodo de 12 horas. Como controle, plantas foram pulverizadas somente com água destilada autoclavada. Após a inoculação, todas as plantas foram cobertas com sacos plásticos transparentes, previamente borrifados com água em seu interior até o momento das coletas.

Foram realizadas quatro coletas de folhas, ocorridas às 14, 24, 48 e 72 horas após a inoculação. As folhas foram coletadas, armazenadas em tubo Falcon (50 mL) estéril e

mantidas em nitrogênio líquido, posteriormente maceradas manualmente e armazenadas em freezer -80 °C. Para ambos os regimes térmicos, foram realizadas três repetições biológicas em cada tempo de coleta. A unidade experimental foi constituída por um vaso com três plantas.

Para cada repetição biológica, 100 mg do tecido foliar foi adicionado em um microtubo contendo 1 mL de solução salina (0,85%), agitado em vortex por aproximadamente 1 minuto e mantido em repouso por aproximadamente 15 minutos. Foi realizada uma diluição seriada e a partir da concentração de 10^{-3} , foram retiradas quatro alíquotas de 10 µL e depositadas em placas de Petri com meio TSA. Após incubação a 28 °C por 48 h as colônias morfolologicamente características de *P. ananatis* foram contabilizadas

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Para ambos regimes térmicos, foram realizadas 24 repetições por tempo de coleta (3 repetições biológicas e 8 repetições técnicas). Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de Bartlett e normalidade de Shapiro-Wilk, seguidos de análise de variância e teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.4.6 Temperaturas Na Severidade De Lesões De *Pantoea ananatis* Em Milho

Plantas de milho foram cultivadas e preparadas conforme descrito no item 3.4.5. As folhas foram coletadas aos sete dias após a inoculação. As avaliações foram realizadas coletando todas as folhas sintomáticas das plantas, fotografadas e as variáveis mensuradas pelo sistema de análise foliar WinDIAS *Leaf Image Analysis System - Delta-T Devices*. As avaliações consistiram na análise de severidade da doença, área foliar sadia, área foliar afetada e área foliar total.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 21 repetições para os dois tratamentos de regime térmico (25 °C e 25/15°C a cada 12h). Cada repetição foi composta por um vaso com três plantas. Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de Bartlett e normalidade de Shapiro-Wilk, seguidos de análise de variância e teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.4.7 Temperaturas Na Expressão De Genes De Virulência De *Pantoea ananatis* Em Milho

Plantas de milho foram cultivadas, preparadas e inoculadas conforme descrito no Item 4.5, sendo a testemunha tratada com água destilada estéril. As plantas foram submetidas a dois tratamentos com temperaturas: 25°C contínuos e 25°C alternando para 15 °C a cada 12 horas. Nos dois tratamentos avaliados, as coletas do material vegetal foliar ocorreram às 14, 48 e 72 horas após a inoculação.

Para avaliar o nível de expressão dos genes *fliM*, *eanI*, *motA*, *tagH*, *HmsP*, *omptin* e *cspD* nas diferentes temperaturas, foram obtidas amostras de RNA total utilizando o *kit SV Total RNA Isolation System* (Promega), extraídas de acordo com as especificações do fabricante. A integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, e a concentração e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria, utilizando-se o NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Califórnia, EUA). Para a síntese de cDNA utilizou-se o *kit GoScript™ Reverse Transcriptase System* (Promega), de acordo com instruções do fabricante.

Os *primers* (Tabela 4) utilizados na análise de *Real Time Quantitative PCR* (RT-qPCR) foram desenvolvidos com auxílio do *software* Primer3 v.0.4.0. Foram selecionados genes relacionados à patogenicidade de *P. ananatis*, como *quorum sensing* (*eanI*), Sistema de Secreção tipo VI (*tagH*), motilidade flagelar (*motA* e *FliM*), formação de biofilme (*hmsP*), proteinase (*omptin*) e proteína de choque frio (*cspD*).

Tabela 4. *Primers* utilizados para análise de expressão gênica por -RT-qPCR,

Gene	ID	Sequência	Amplicon (pb)
<i>eanI</i>	KM249358.1	TGAAGAGCTGCAAACACAC AAACTCATCCGACTCCATGC	115
<i>motA</i>	NC_017554.1 Gene ID 57267928	ACTGGAGCGCGATATTGAAG CCACTGACCATAAGGCGTAAA	120
<i>fliM</i>	NC_017554.1 Gene ID: 57267805	GATGCGTGGAAAGCCATTTATC CGTTAGGTGATGTGGTGATGT	91
<i>hmsP</i>	NC_017554.1 gene ID 57270224	CAGCGATTTCTGTTCTGTTGATG AGATTGACGGGCTGGTTTAG	99
<i>omptin</i>	NC_017554.1 GenBank: CP003085.1; region 39443-40375	ACGACTGGCAAGACAGTAATC CTGTAGGAACCACCCTTTTCAG	113

<i>tagH</i>	NC_017554.1 – Gene ID: 57267740	AAGATCCGCTGGCTCAGTTA TCCTGAGCAAACAGTGCATC	103
<i>ffh</i>	NC_017554.1 gene ID: 57267083	AGGTTCACGCCGCAATTA ATCCACCTTCGTCAGAATAACC	134
<i>cspD</i>	CP003085 region: 3052814..3053038	GGACGGCAGCAAAGATGTATTC CCAACAACGTTCGCAGCAG	83

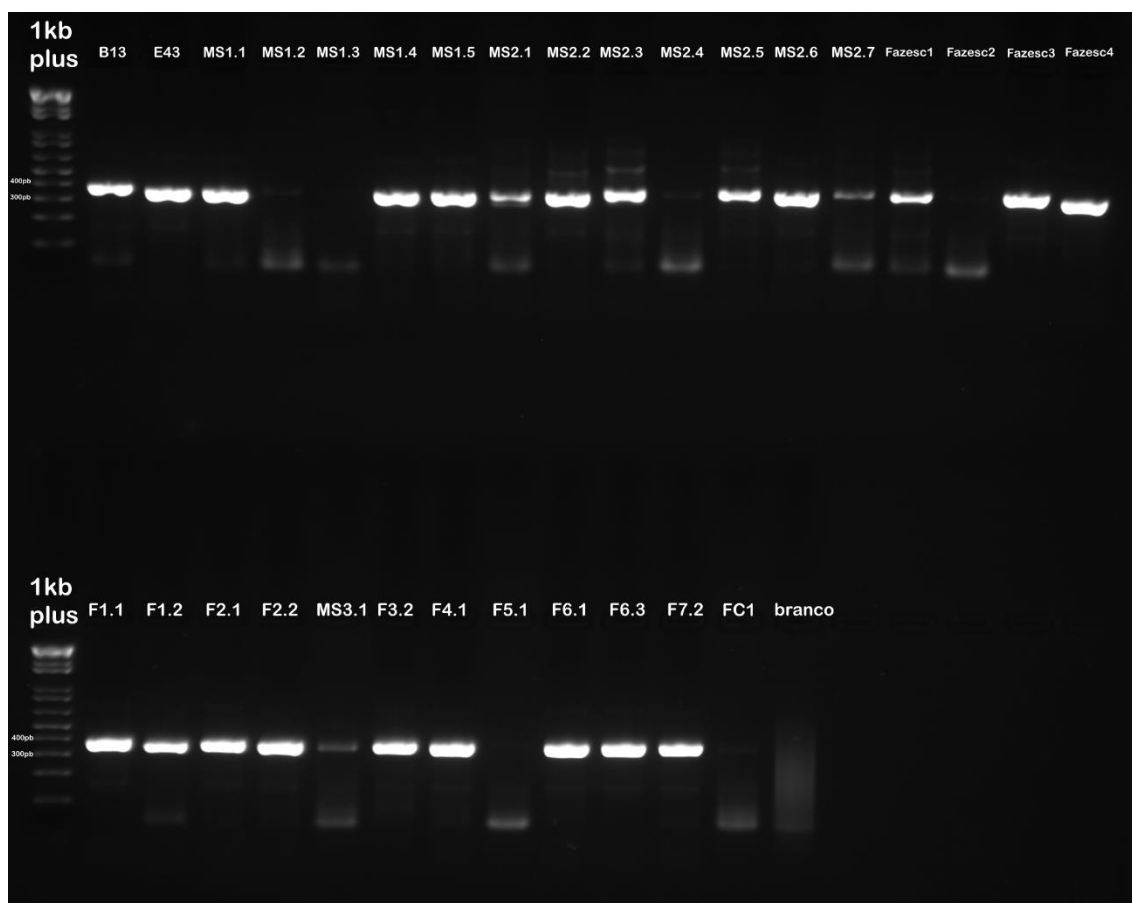
As análises de RT-qPCR foram conduzidas com o 5 µL de *GoTaq™ qPCR MasterMix* (Promega), 0,3-0,4 µL de *primer* direito (10 nM), 0,3-0,4 µL de *primer* reverso (10 nM) e 3,4-3,2 µL de água livre de nucleases e 1 µL de cDNA. Em termociclador ViiA7 (Thermo Scientific), as condições das reações foram 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 20 s, 72°C por 30 s e os dados coletados na fase de extensão. Os níveis relativos de transcritos foram determinados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O gene *ffh* foi utilizado para normalização dos dados, devido à estabilidade como referência interna (TAKLE et al., 2007; LIN et al., 2014; SIBANDA et al., 2018; SHIN et al., 2019). Os perfis transcricionais dos genes foram avaliados em triplicata biológica e triplicata técnica por tratamento. Os dados foram normalizados de acordo com Willems, Leyns, Vandesompele (2008). Para análise dos dados, foi calculado o Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade, utilizando a Distribuição *t* (COLEGRAVE, RUXTON, 2003).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Identificação, Caracterização Molecular De Isolados E Teste De Patogenicidade De *Pantoea ananatis*

A frequência de isolamento de *P. ananatis* foi de 76,6% (Figura 4, Tabela 5), com amplificação de um fragmento único próximo a 360-380 pares de base. Cinco isolados não foram amplificados com o par primer PANAF/PANAR.

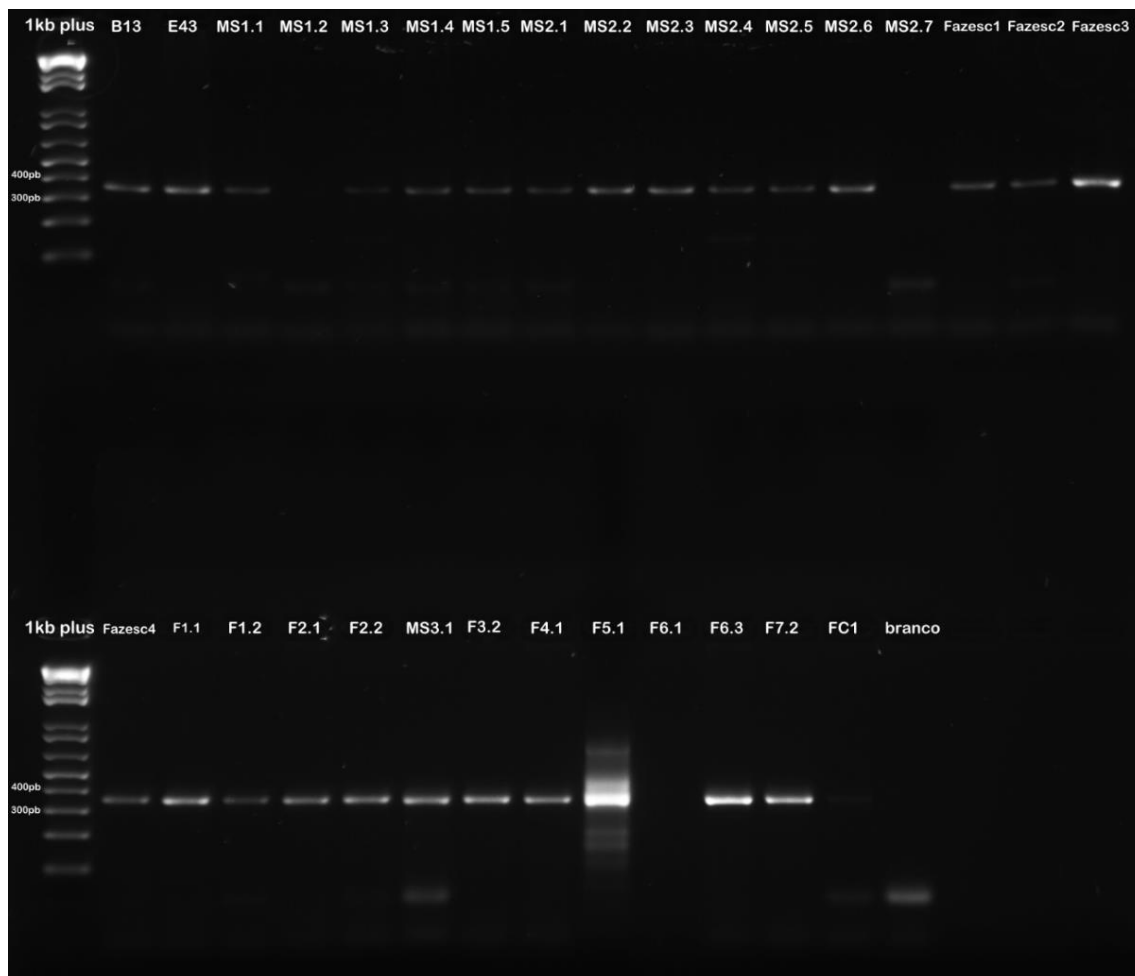
Figura 3. Gel de agarose a 2%, produtos da PCR da região do gene 16-23S rRNA de *Pantoea ananatis*, amplificando um produto de 360-380 pares de base.



Uma vez que a temperatura foi citada por Costa et al. (2013) como uma variável que influencia o aumento da severidade da mancha branca do milho, os isolados foram avaliados quanto a presença do gene *inaA*. A presença de um gene de nucleação de gelo (*inaA*) em *P. ananatis* foi apontada por Rocha et al. (2019) como um possível fator de patogenicidade, relacionado com a variável temperatura. A expressão deste gene confere à bactéria a capacidade de formar núcleos de gelo em temperaturas mais altas do que normalmente ocorreria.

O gene de nucleação de gelo parece estar presente em grande parte de isolados bacterianos (90,6%). Neste estudo, apenas os isolados MS1.2, MS2.7 e F6.1 não apresentaram amplificação para gene *inaA* (Figura 5). A alta frequência do gene de nucleação de gelo já foi reportada para isolados de *P. ananatis* (ROCHA et al., 2010) e de 90 isolados apenas 3 não apresentaram o gene *inaA* (MILLER et al., 2016).

Figura 4. Gel de agarose a 2%, de produtos de PCR com a região do gene *inaA* de *Pantoea ananatis*, amplificando um produto de 350-400 pares de base.



Embora somente três isolados não apresentaram o gene de nucleação de gelo, a célula bacteriana por um determinado momento pode não expressar esta característica fenotípica, devido a alterações fisiológicas no metabolismo e na maturação celular bacteriana (LINDOW, 1983). De acordo com Miller et. al (2016) apenas 83,34% dos isolados de *P. ananatis* continham o gene de nucleação de gelo, e apenas 9 de 15 isolados foram positivos para esta atividade (SAUER et al. 2024).

Alguns dos isolados não causaram resposta de hipersensibilidade em plantas de tabaco, no entanto, quando inoculadas em plantas hospedeiras, provocaram sintomas de necrose (Tabela 5). Outro ponto é que isolados PCR negativos para *P. ananatis*, mas PCR positivos para o gene de nucleação de gelo, foram observados causando respostas em tabaco ou milho, concordando que a presença do gene não é exclusiva de *P. ananatis* e podem ocorrer em outras espécies fitopatogênicas, como *Pseudomonas syringae*,

Xanthomonas campestris e *Erwinia herbicola* (LINDOW, 1987; KIM et al., 1987; MILLER et al., 2001).

Tabela 5. Caracterização de isolados bacterianos de milho quanto a espécie *Pantoea ananatis* e presença do gene de nucleação de gelo (*inaA*), teste de hipersensibilidade em tabaco e patogenicidade em milho

Isolados	<i>Pantoea ananatis</i>	Gene <i>inaA</i>	Hipersensibilidade	Patogenicidade
			tabaco	milho
UFU B13	+	+	+	+
E43	+	+	+	+
MS1.1	+	+	-	+
MS1.2	-	-	-	-
MS1.3	-	+	-	-
MS1.4	+	+	+	+
MS1.5	+	+	-	+
MS2.1	+	+	-	+
MS2.2	+	+	-	+
MS2.3	+	+	-	-
MS2.4	-	+	-	+
MS2.5	+	+	-	+
MS2.6	+	+	+	+
MS2.7	+	-	-	+
Fazesc1	+	+	+	+
Fazesc2	-	+	-	-
Fazesc3	+	+	-	+
Fazesc4	+	+	+	+
F1.1	+	+	-	-
F1.2	+	+	+	-
F2.1	+	+	-	+
F2.2	+	+	-	+
MS3.1	+	+	-	-
F3.2	+	+	+	+
F4.1	+	+	+	+
F5.1	-	+	+	+
F6.1	+	-	+	+
F6.3	+	+	+	+

F7.2

+

+

+

+

* representa resultado positivo (+) ou negativo (-) para a espécie, presença do gene *inaA*, hipersensibilidade em tabaco ou patogenicidade em milho.

Para Rocha et al. (2019), a capacidade de nucleação de gelo pode estar envolvida no desenvolvimento de lesões da mancha branca do milho. Porém, não há evidências conclusivas de que a capacidade de nucleação de gelo esteja diretamente relacionada à virulência de *P. ananatis*, mas pode ser um fator importante a ser considerado no manejo da doença. Neste estudo, cepas de *P. ananatis*, como MS2.3, F1.1 e MS1.3, mesmo com a presença do gene *inaA*, não causaram sintomas em tabaco ou em milho, nas condições avaliadas neste trabalho (Figuras 6 e 7).

Figura 5. Teste de hipersensibilidade de isolados bacterianos em tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*). A necrose do tecido confirma a patogenicidade dos isolados.

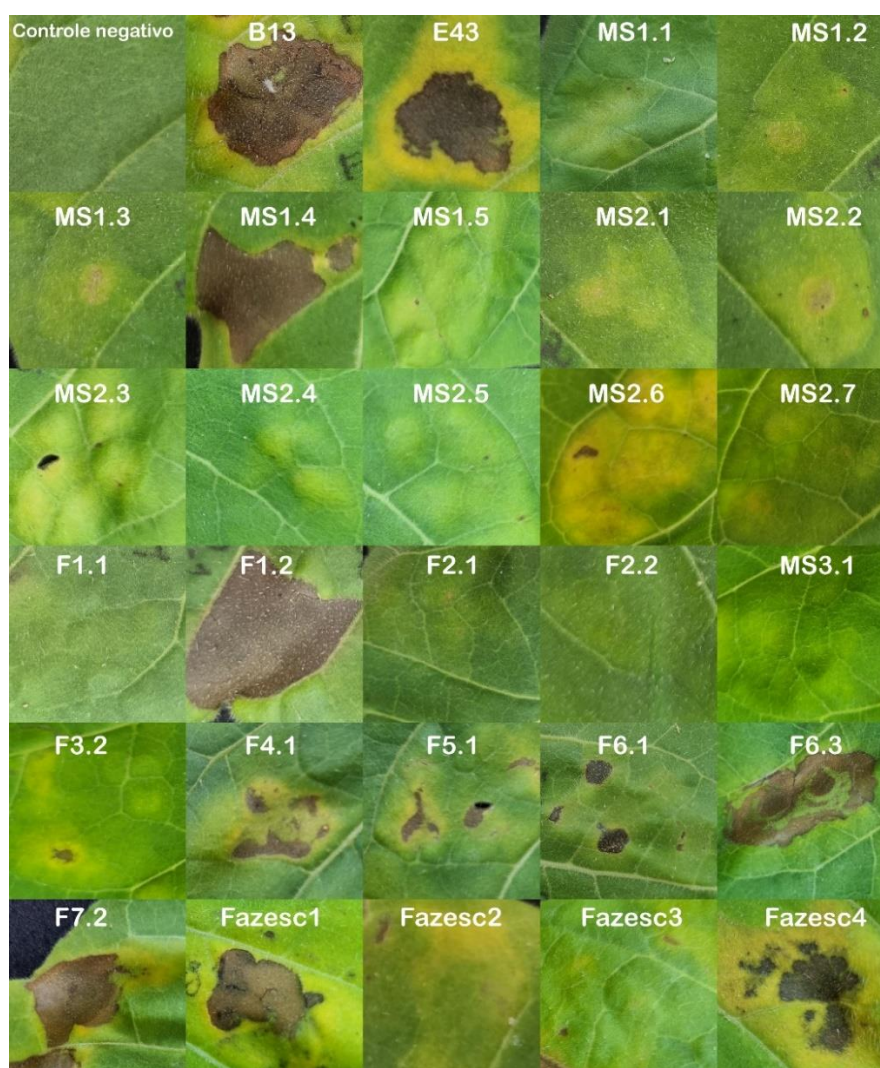
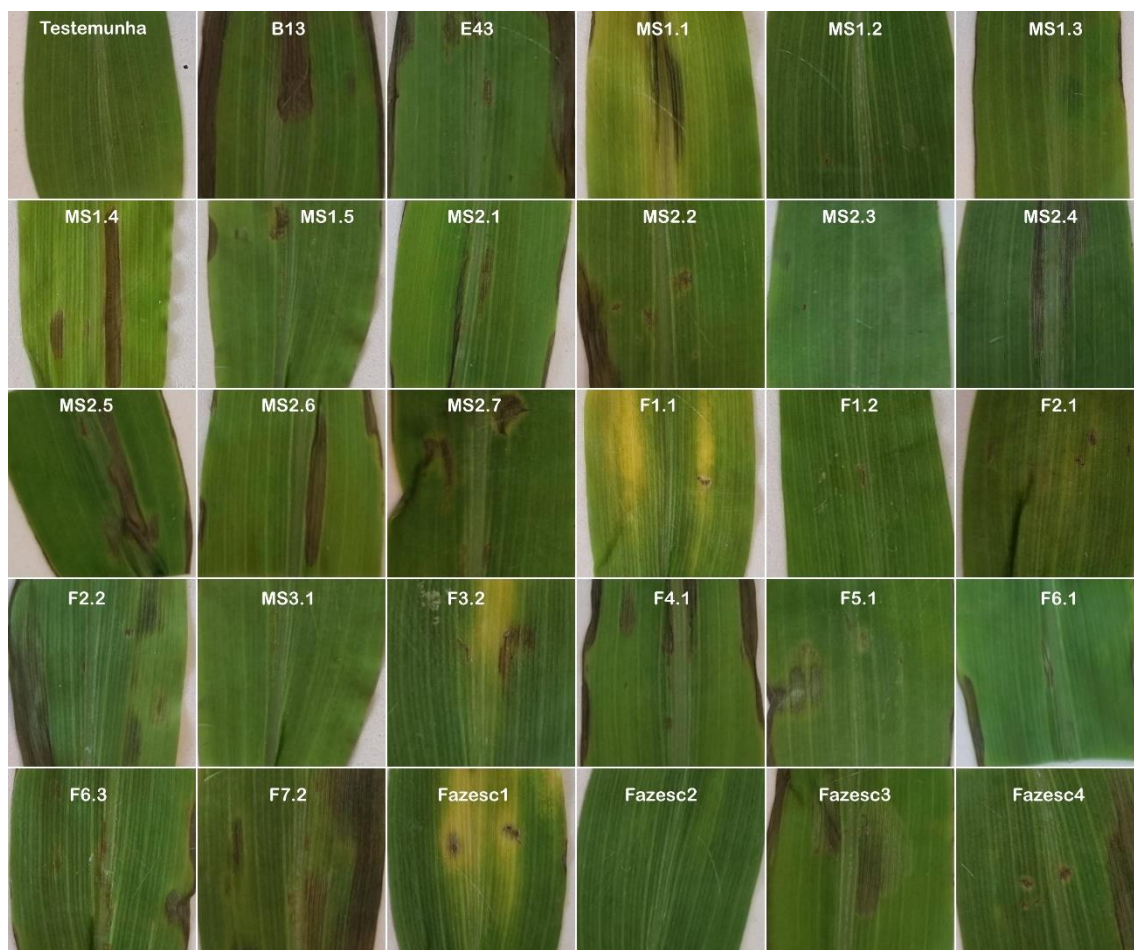


Figura 6. Teste de patogenicidade de isolados bacterianos (10^8 UFC. mL⁻¹) em folhas de milho (Fórmula – Syngenta®) aos sete dias após a inoculação através do método de infiltração.

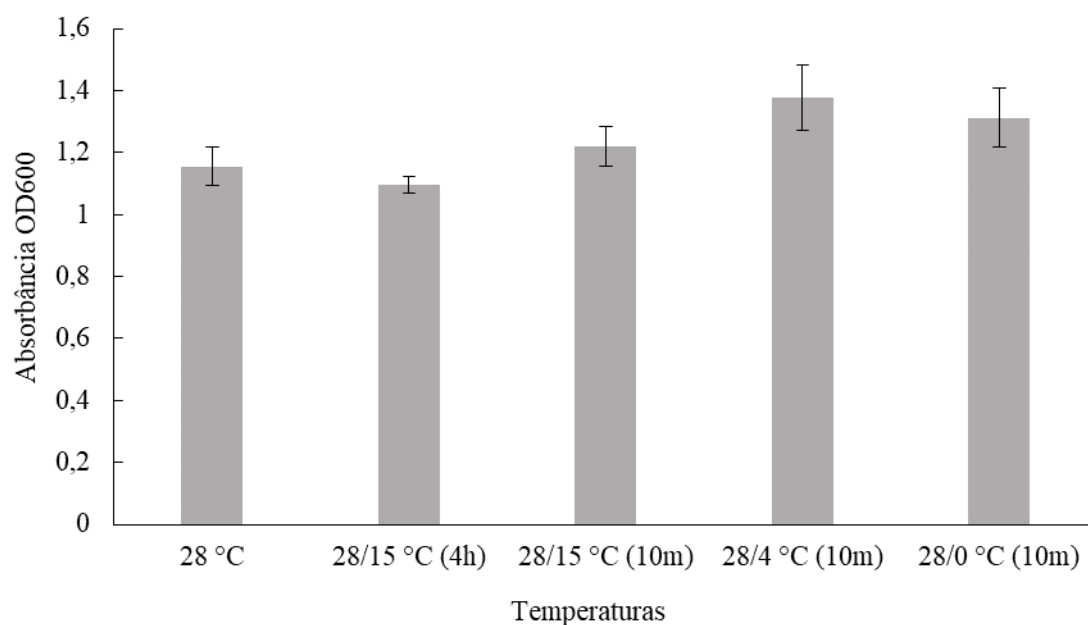


Além destas evidências, os resultados demonstram o desenvolvimento de lesões em milho inoculado com as cepas MS 2.7 e F6.1, isolados que se mostraram negativos para a presença do gene *inaA*. Isto fortalece a hipótese de não essencialidade do gene para a patogenicidade da bactéria, mas ainda assim podendo estar correlacionado com o desenvolvimento de lesões em milho (ROCHA et al., 2019; SAUER et al., 2014).

3.5.2 Temperaturas Na Densidade Populacional de *Pantoea ananatis* *in vitro* e *in planta*

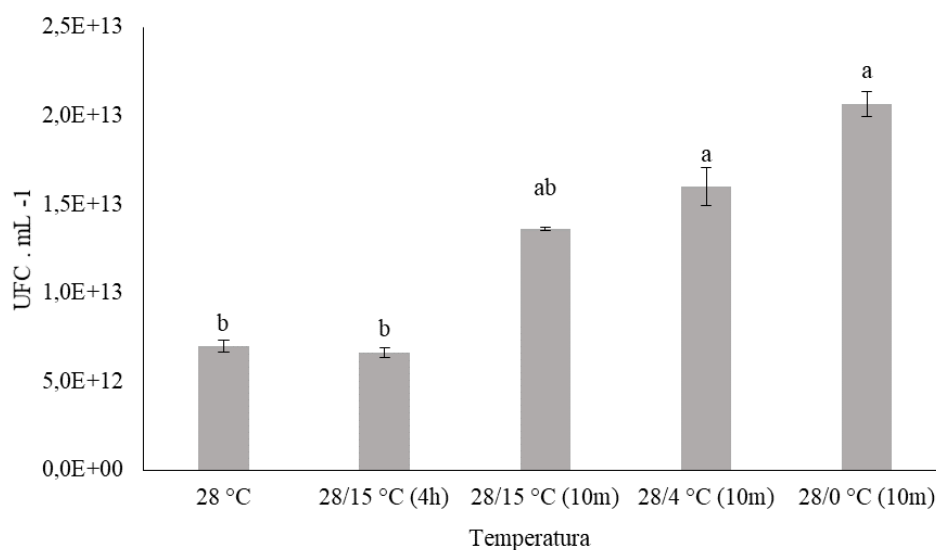
A turbidez do meio experimental não foi sensível o suficiente para detectar alterações na população bacteriana. A absorbância (Figura 8) demonstra que não houveram diferenças significativas nas variações de densidade populacional bacteriana, mesmo após mudanças de temperatura.

Figura 7. Absorbância (OD_{600}) em espectrofotômetro do crescimento de *P. ananatis* em regimes de temperatura. Legenda: h=horas; m=minutos; OD_{600} =densidade óptica a 600 nm. Barras de erro representam o erro padrão da amostra.



Os resultados da técnica de microgota se mostraram mais sensíveis na estimativa da densidade populacional de *P. ananatis* (Figura 9). A maior amplitude do choque térmico influenciou positivamente o crescimento populacional da bactéria. Quando submetidas 10 minutos a 4°C (T4: 28 °C por 23 h 50 e 4 °C por 10 min) e a 0°C (T5: 28 °C por 23 h 50 e 0 °C por 10 min) houve um aumento populacional significativo da bactéria em relação a 15 °C, por 4 horas (T2: 28 °C por 20 h e 15°C por 4 h) ou 10 minutos (T3: 28 °C por 23 h 50 e 15 °C por 10 min).

Figura 8. Unidades Formadoras de Colônias (UFC). mL⁻¹ do isolado UFU B13 de *P. ananatis* em tratamentos com regimes de temperatura. Legenda: h=horas; m=minutos. Barras de erro representam o erro padrão da amostra



Embora um choque térmico frio possa afetar a população bacteriana, este resultado pode variar com base na espécie bacteriana, na intensidade e na duração do choque frio, na capacidade de adaptação e no estado fisiológico da bactéria. Uma breve exposição a temperaturas frias pode retardar temporariamente o crescimento bacteriano, enquanto a exposição prolongada ou condições de frio extremo podem levar a danos celulares ou morte celular (GRAUMANN, MARAHIEL, 1996; VIRTANEN et al., 2018). Além disso, a fase de crescimento da bactéria no momento do choque frio também é um fator a ser levado em consideração (FARRELL, ROSE, 1968).

O crescimento de populações bacterianas é caracterizado por quatro fases distintas em culturas mantidas sob condições ideais, a fase de latência (lag), fase exponencial (log), fase estacionária e a fase de morte. A latência marca o início da adaptação da bactéria, onde as células se preparam para replicação, portanto, não há aumento significativo no número de células. A fase exponencial, ou logarítmica, é caracterizada pelo rápido crescimento populacional, com reprodução ativa e aumento exponencial do número de células. Durante a fase estacionária ocorre um equilíbrio na população, onde a taxa de multiplicação se iguala à taxa de morte celular, resultando em estabilização do número total de células. As condições do meio deterioram-se, levando à entrada em quiescência, ocorrendo a transição para a fase de morte, com mais células morrendo do que sendo produzidas (MAIER, PEPPER, 2015).

A duração das fases de crescimento bacteriano pode variar dependendo das condições específicas do meio de cultura e do ambiente em que as bactérias estão

crecendo. No trabalho de Zheng et al. (2017), a fase estacionária de um isolado de *P. ananatis* cultivado em caldo LB durou aproximadamente 6 horas, seguido de 12 horas na fase logarítmica e nas 24 horas de cultivo, encontrava-se na fase estacionária.

De acordo com Farrel e Rose (1968), a fase exponencial de crescimento da bactéria é a que torna mais sensível a população bacteriana ao choque frio. Durante esta fase, as células estão ativamente se dividindo e são mais sensíveis a mudanças repentinas de temperatura. A fase de crescimento em que se encontrava a população de *P. ananatis* (Tabela 6) quando o choque térmico a 15°C (20 horas de cultivo no T2 vs. 23h50 horas de cultivo no T3) poderia explicar o aumento de 48,95% na população bacteriana do tratamento 3 em relação ao controle.

Tabela 6. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL e aumento absoluto e relativo (%) do crescimento bacteriano de *P. ananatis* UFU B13 em diferentes regimes de temperaturas

Tratamentos	UFC. mL ⁻¹	Aumento de UFC. mL ⁻¹	Aumento relativo (%)
T1 – 28 °C	6,96E+12	-	-
T2 – 28/15 °C (4h)	6,62E+12	-3,35E+11	-5,05
T3 – 28/15 °C (10min)	1,36E+13	6,67E+12	48,95
T4 – 28/4 °C (10 min)	1,60E+13	9,01E+12	56,43
T5 – 28/0 °C (10 min)	2,07E+13	1,37E+13	66,31

Legenda: h=horas; m=minutos

É importante citar que em um meio de cultura rico e sob condições ideais, uma célula bacteriana pode dividir-se em apenas 10 minutos (MAIER, PEPPER, 2015). O tratamento T3, T4 e T5 aumentaram em 48,95; 56,43 e 66,31% o número de colônias em comparação à testemunha, mostrando que mesmo uma temperatura mais baixa por 10 minutos pode interferir na população bacteriana.

Para Kouba et al. (2022), a exposição de bactérias com atividade Anaerobic Ammonium Oxidation (ANAMMOX) a temperaturas extremamente baixas induziu uma resposta adaptativa mais eficiente. Estes autores ainda observaram que quanto maior a amplitude térmica do choque frio, a adaptação ocorreu mais rápido.

Hébraud et al. (1999) relatam o desafio a respeito de entender a adaptação de bactérias ao frio. Segundo os autores, o crescimento e a multiplicação celular em

temperaturas baixas se deve às estratégias adaptativas. Microrganismos psicrotróficos e psicrofílicos apresentam várias adaptações para sobreviverem e crescerem em ambientes frios. Essas adaptações incluem alterações na composição de ácidos graxos da membrana celular, produção de proteínas de choque frio, aumento da atividade enzimática, aumento da produção de solutos compatíveis, aumento da capacidade de transporte de nutrientes e aumento da capacidade de reparo do DNA. Essas adaptações permitem que os microrganismos cresçam e se reproduzam em temperaturas mais baixas, o que é importante para sua sobrevivência em ambientes frios (BERRY, FOEGEDING, 1997).

Farrel e Rose (1968), citam que uma das adaptações ao frio é a indução de proteínas de choque frio. As proteínas de choque frio desempenham papel crucial na adaptação e sobrevivência de microrganismos em baixas temperaturas. Elas ajudam a manter a estrutura e a função das proteínas celulares em temperaturas mais baixas, auxilia na estabilidade e na atividade enzimática necessárias para o crescimento e a sobrevivência em ambientes frios. Além disso, as proteínas de choque frio podem estar envolvidas na regulação da expressão gênica e na proteção contra danos celulares causados pelo estresse térmico (BERRY, FOEGEDING, 1997).

Quando *Escherichia coli* se encontra em crescimento exponencial a 37 °C e é transferida para 10 °C, cessa a maior parte da síntese proteica, no entanto, cerca de 14 proteínas de “choque frio” continuam a ser produzidas. Estas proteínas facilitam o crescimento bacteriano em baixas temperaturas (WOLFFE, 1995). Na literatura é possível encontrar estudos que citam o papel de proteínas de choque frio na multiplicação de bactérias. Zhou et al. (2021) incluíram o gene *cspL*, de *Bacillus*, em uma cepa de *E. coli*, bactéria mesófila. Autores observaram que a transgenia possibilitou um aumento de biomassa de 2,4 vezes quando *E. coli* cresceu a 45 °C, ou seja, a ação das proteínas não se restringe apenas ao ambiente frio. Para *Bacillus subtilis*, a deleção dos genes que codificam para proteínas de choque frio, *cspC* ou *cspD*, fez com que houvesse uma redução severa no crescimento celular a 15°C, bem como a 37°C, incluindo comprometimento da sobrevivência durante a fase estacionária (GRAUMANN et al., 1997).

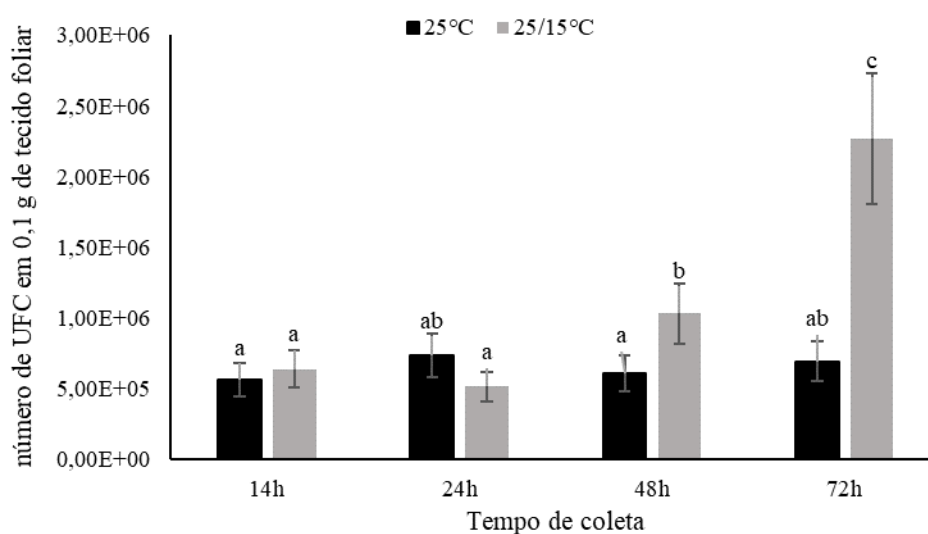
Em *Lactobacillus plantarum*, a produção de *CspC* ocorreu durante a fase exponencial e contribuiu para o crescimento na fase estacionária. A presença de *CspC* em células em crescimento exponencial sugere seu envolvimento no crescimento inicial e na adaptação a estresses ambientais específicos, enquanto a superprodução de *CspC* permitiu uma retomada mais rápida do crescimento quando culturas em fase estacionária foram

diluídas em meio fresco, indicando seu papel na recuperação de células nutricionalmente privadas (DERZELLE et al., 2003).

De acordo com Chattopadhyay (2006), as proteínas do estresse frio são encontradas em bactérias mesofílicas e psicofílicas, sendo que apenas nas últimas, como em *P. ananatis*, são observadas as proteínas de aclimação ao frio (*Caps*). Estas proteínas, como a *Hsc 25* descrita em um isolado de *P. ananatis* por Kawahara et al. (1999), são superexpressas em temperaturas baixas, podendo facilitar processos como transcrição e tradução, e aumentar a estabilidade de enzimas frente ao frio.

De acordo com Escanferla et al. (2018), bactérias INA+ epifíticas, como *P. ananatis* em milho, podem tornar-se patogênicas com aumento populacional, especialmente após chuvas e alta umidade, seguidas de quedas de temperatura. Nossos resultados corroboram com os dos autores supracitados, especialmente o aumento populacional de *P. ananatis* após mudanças de temperatura, como demonstrado na Figura 10. O choque térmico a 15 °C por 12 horas resultou em um aumento significativo da população bacteriana 48 e 72 horas após a inoculação, enquanto a população se manteve estável a 25 °C. Plantas sujeitas a choques térmicos de 15 °C a cada 12 horas apresentaram duplicação na população bacteriana de 24 a 48 horas e de 48 a 72 horas após a inoculação.

Figura 9. Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Pantoea ananatis* (isolado UFU B13) em 0,1g de tecido foliar de plantas de milho inoculadas e submetidas a regimes de temperaturas. Barras de erro indicam o erro padrão da amostra.



Gross et al. (1983) mencionam que as populações de bactérias INA+ em superfícies foliares variaram ao longo do ano, apresentando níveis mais elevados durante

a primavera fresca e úmida, seguidas por uma diminuição durante os meses mais quentes e secos do verão. Posteriormente, houve aumento gradual durante o outono. Torres et al. (2005) observaram que uma cepa de *P. ananatis* utilizada como controle biológico manteve uma população significativa (10^4 UFC) na superfície de frutos de citros por até 3 meses a uma temperatura de 1°C. Entretanto, no caso deste estudo, a população de *P. ananatis* não se encontrava apenas na superfície foliar, mas certamente colonizando os espaços intercelulares.

A observação de uma maior multiplicação da bactéria em plantas submetidas ao choque frio concorda com os resultados de densidade mais elevada no cultivo *in vitro*. Embora estudos anteriores, como os de Berry e Foegeding (1997), apresentem pontos divergentes, destacando um crescimento mais lento das bactérias em temperaturas mais baixas devido à redução da atividade metabólica, é importante notar que tais estudos geralmente consideram a temperatura baixa de forma constante ao longo do tempo, ao contrário das oscilações testadas neste experimento.

Conforme afirmado por Zhang e Gross (2021), a exposição abrupta a um choque térmico frio resulta em uma diminuição do crescimento bacteriano, mas a dinâmica dessa redução varia entre as espécies bacterianas e as condições específicas do choque frio. Em relação à bactéria mesófila *E. coli*, a exposição ao choque frio desencadeia uma fase de aclimação, durante a qual o crescimento celular é totalmente interrompido. Durante essa fase, ocorre a produção de proteínas de choque frio, que auxiliam na adaptação das células à baixa temperatura. Posteriormente, após a fase de aclimação, o crescimento é reiniciado, embora a uma taxa mais lenta (KAUR, KHANNA, 2017). No entanto, algumas bactérias não apresentam essa fase de aclimação, e o crescimento persiste a uma taxa intermediária até atingir o estado estacionário. Essas espécies englobam as bactérias mesofílicas *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecalis*, além da bactéria psicrofílica *Vibrio* sp.

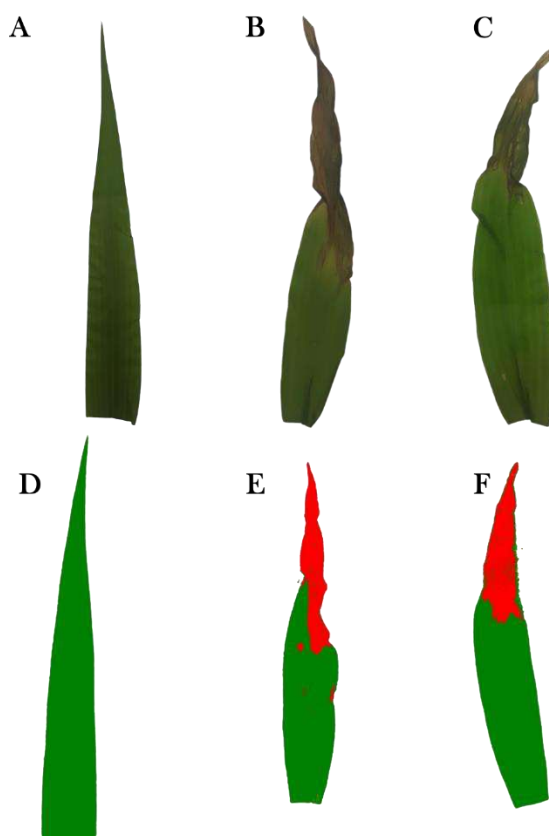
Dessa maneira, essas observações sugerem a presença de mecanismos próprios da espécie que podem influenciar a resposta de diferentes bactérias ao choque frio. O tempo necessário para a readaptação não pode ser completamente atribuído à faixa de temperaturas ideais de crescimento ou à filogenia das espécies bacterianas. A pesquisa realizada neste trabalho é o primeiro estudo que relata o aumento populacional de bactérias em curto período após o choque frio, portanto, os mecanismos envolvidos na maior multiplicação não foram completamente elucidados, sendo necessários maiores estudos para o entendimento da rápida divisão destas células bacterianas. A densidade

populacional alta é fator chave para a ocorrência da doença mancha branca em milho (ROCHA et al., 2019; ESCANFERLA et al., 2006).

3.5.3 Temperatura Na Severidade De Lesões Causadas Por *Pantoea ananatis* Em Milho

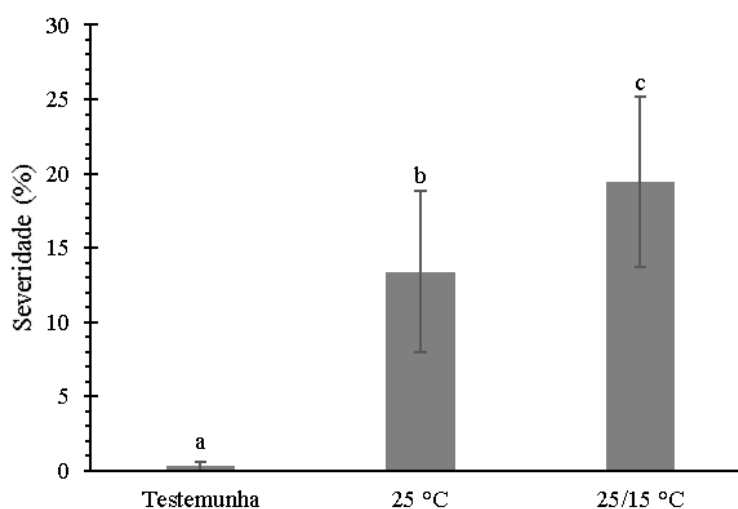
A queda de temperatura determinou um aumento na severidade de lesões causadas por *P. ananatis* em plantas de milho. Os sintomas observados em plantas de milho em estágio fenológico vegetativo e inoculadas com *P. ananatis* foram os mesmos relatados por Zhao et al. (2021). Plantas inoculadas e mantidas a 25 °C contínuos exibiram sintomas de infecção pela bactéria (Figura 11). No entanto, a severidade das lesões foi significativamente maior quando as plantas passaram por uma queda de temperatura, a 15 °C por 12h (Figura 12). O acréscimo foi, em média, de 31% na severidade em plantas que sofreram oscilações de temperatura.

Figura 10. Severidade de lesões causadas por *P. ananatis* (isolado UFU B13) inoculada em folhas de milho (Fórmula - Syngenta®) e mantidas sob diferentes regimes térmicos. (A-D) Testemunha sem inoculação (B-E) plantas mantidas a 25/15 °C a cada 12 h e (C) plantas mantidas a 25 °C. (D-F) leitura da área foliar afetada mensurada pelo sistema de análise foliar *Windias*®.



Ressalta-se que a queda de temperatura de 25 °C para 15 °C por um período de 12 h, não pareceu ser essencial para a ocorrência de lesões, mas sim na intensificação da severidade da doença (Figura 12). Isso porque a umidade relativa não sofreu variações durante a condução deste experimento, sendo apontado por Fernandes et al. (1995) como um dos fatores mais limitantes para a ocorrência da doença.

Figura 11. Média de severidade (%) de lesões em folhas de milho inoculadas com *P. ananatis* (isolado UFU B13) submetidas a 25 °C ou 25/15 °C a cada 12h. Barras representam o desvio padrão da amostra e letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Costa et al. (2013), concordando com Fernandes et al. (1995), observaram que o aumento da AACPD e da severidade da mancha branca do milho coincidiram com a diminuição da temperatura mínima média diária, entre 19,44 °C e 17,42 °C, momento em que a umidade relativa média manteve-se em torno de 75%. Fernandes e Oliveira (1997) também observaram que temperatura noturna em torno de 14 °C é uma das condições favoráveis para o desenvolvimento de epidemias.

As mudanças ambientais, especialmente as flutuações de temperatura e umidade durante o ciclo de crescimento do milho, foram apontadas por Xing et al. (2023) como importante fator na ocorrência da doença. Eventos meteorológicos podem induzir variações na temperatura e umidade ambiental, afetando a ecologia microbiana, bem como as respostas fisiológicas das plantas de milho nos diferentes estágios de desenvolvimento. Tais mudanças podem alterar a suscetibilidade do hospedeiro ou suas interações com patógenos. A duração da umidade superficial e da umidade relativa se constituem em fatores ambientais cruciais na patogênese e progressão de numerosos

patógenos de plantas, inclusive de *P. ananatis* (XING et al., 2023). No Paraná, observa-se a uma média mensal histórica de temperaturas mínimas de 13,4 °C, durante os meses de março a agosto, época em que o cultivo de milho segunda safra está ocorrendo (IDR-PR, 2024). O possível impacto das temperaturas baixas pode refletir no desenvolvimento da doença mancha branca e no sistema de defesa de plantas de milho.

Foyer et al. (2002) destacam a sensibilidade das folhas de milho a temperaturas baixas, o que pode resultar em inibição substancial da assimilação de CO₂ e na regulação negativa do transporte de elétrons fotossintéticos, podendo tornar as plantas mais suscetíveis a danos oxidativos e a respostas fisiológicas adversas, o que, por sua vez, pode afetar a capacidade das plantas de resistir a estresses. De acordo com Goering et al. (2021) controlar a tolerância de milho à exposição a baixas temperaturas pode melhorar potencialmente a resposta a doenças. Concordando com os resultados obtidos neste estudo, na Figura 13 é evidente que plantas inoculadas e mantidas a 25 °C apresentaram menor severidade quando comparadas às mantidas no regime de alternância e queda de temperatura de 25 °C para 15 °C.

Figura 12. Plantas de milho inoculadas com *Pantoea ananatis* (isolado UFU B13). (A) Testemunha sem inoculação (B) plantas mantidas a 25/15 °C a cada 12h e (C) plantas mantidas a 25 °C.



A maior severidade de lesões em plantas submetidas à queda de temperatura está potencialmente ligada às respostas de estresse das plantas de milho, que pode reduzir sua imunidade frente aos patógenos. Por outro lado, convém observar a hipótese de maior virulência da bactéria. A virulência refere-se à capacidade do microrganismo de causar doenças em um hospedeiro (CASADEVALL; PIROFSKI, 2003). É uma medida da patogenicidade, ou seja, da capacidade de um organismo causar danos ao hospedeiro e provocar sintomas ou doenças.

Bactérias patogênicas possuem diversos mecanismos que contribuem para sua virulência, permitindo-as invadir, colonizar e resistir às defesas do hospedeiro (MELOTTO, KUNKEL, 2013). De acordo com Diard e Hardt (2017), a virulência de uma bactéria pode ser aumentada por vários fatores, incluindo a aquisição de novos fatores de virulência, mutações que aumentam a expressão ou atividade de fatores de virulência existentes, seleção natural em ambientes com alta densidade de hospedeiros, uso de antibióticos que selecionam cepas mais virulentas e a pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico do próprio hospedeiro.

O estudo de Ullrich et al. (2001) acrescenta uma camada valiosa a esta pesquisa, destacando que as bactérias fitopatogênicas são capazes de detectar as condições adequadas para a infecção e sobrevivência em suas plantas hospedeiras, potencialmente guiadas por mudanças de temperatura, sinais transportados pelas plantas, pH, osmolaridade e disponibilidade de nutrientes. A resposta aos sinais ambientais envolve o reconhecimento de pistas específicas que permitem que as bactérias infectem com sucesso a planta hospedeira, superem os mecanismos de defesa da planta e estabeleçam populações *in planta* propícias ao desenvolvimento da doença.

Em síntese, a integração dos dados deste estudo com as descobertas de Smirnova et al. (2001) revela uma imagem mais abrangente acerca de um possível aumento de virulência de *P. ananatis* em baixas temperaturas. Essa complementaridade destaca a importância de considerar a termorregulação em bactérias fitopatogênicas. Smirnova et al. (2001) destacam como a transcrição de genes de virulência é aumentada em temperaturas abaixo da temperatura ótima de crescimento da bactéria e como isso pode afetar sua patogenicidade. O artigo cita as principais diretrizes que regem o mecanismo de detecção de temperatura em bactérias fitopatogênicas, como a presença de cascatas regulatórias; a potencial função de cinases sensoras, proteínas que desempenham um papel na detecção de sinais ambientais, ancorados na membrana interna da célula; e a influência do grau de saturação dos ácidos graxos da membrana na conformação e atividade de proteínas sensoriais.

A análise detalhada presente no artigo de Smirnova et al. (2001) contribui significativamente ao oferecer insights adicionais sobre os efeitos da temperatura em bactérias associadas a plantas, ampliando a visão da comunidade científica sobre o fenômeno do aumento da virulência destes patógenos. Estes autores relatam que a maioria desses sistemas de termorregulação mostram a expressão aumentada de genes de virulência ou secreção aumentada de proteínas em temperaturas reduzidas, como 16–24

°C. Segundo os autores, este resultado é explicado pelo fato de que a maioria das bactérias fitopatogênicas necessitam de filmes de água ou aerossóis para a infecção eficiente de plantas hospedeiras. Tais películas de água e umidade elevada ocorrem predominantemente quando a temperatura do ar ou a temperatura da superfície da planta é baixa.

A baixa temperatura pode aumentar a virulência das bactérias ao desencadear a expressão de genes de virulência, levando ao aumento na produção de fatores de patogenicidade, como toxinas, enzimas de degradação de tecidos e proteínas de secreção, por exemplo (ARVIZU-GÓMEZ et al., 2013). Destaca-se a importância da compreensão desses mecanismos para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle de doenças de plantas causadas por bactérias fitopatogênicas.

3.5.4 Temperaturas Na Expressão De Genes De Virulência De *Pantoea ananatis* Em Milho

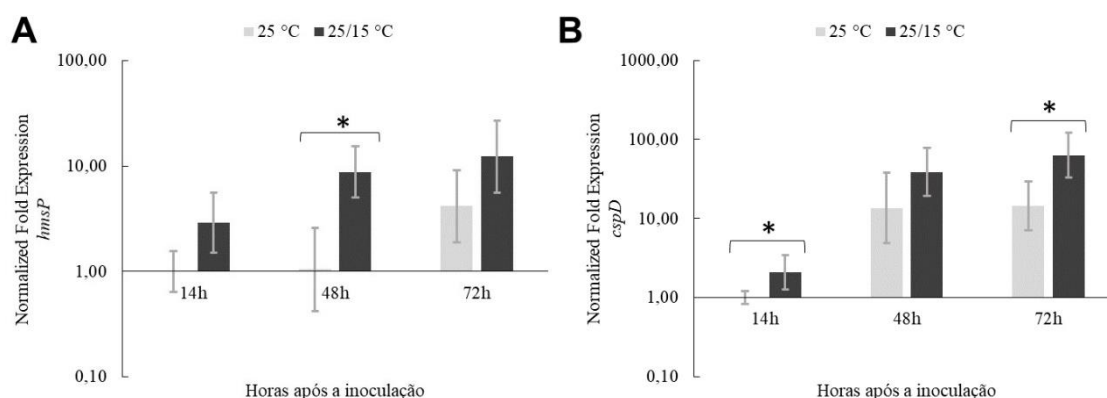
Compreender como as bactérias fitopatogênicas interagem com as plantas hospedeiras e como utilizam seus mecanismos para causar doenças é essencial para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes para o controle de doenças de etiologia bacteriana. A expressão dos genes de virulência em bactérias é influenciada por diversos parâmetros, tais como osmolaridade, pH, concentração de íons, níveis de ferro, fase de crescimento e densidade populacional. Entretanto, a temperatura desempenha papel crucial como estímulo ambiental para a ativação da expressão dos genes de virulência em muitos patógenos (KONKEL, TILLY, 2000).

Pfeilmeier, Caly, Malone (2016) detalham sobre a complexidade do processo de infecção bacteriana em plantas. Inicialmente as bactérias precisam adaptar-se à vida na superfície epifítica, garantindo que sua sobrevivência seja suficiente para iniciar a infecção. Essa sobrevivência epifítica inicial é possível pela formação de biofilme e resistência às alterações climáticas.

Neste trabalho, a expressão dos genes relacionados à formação de biofilme (*hmsP*) e de proteína de choque frio (*cspD*) foi maior em plantas inoculadas com *P. ananatis* e submetidas a 25 °C com queda para 15 °C a cada 12 horas, quando em comparação àquelas inoculadas e mantidas permanentemente a 25 °C (Figura 14). A maior expressão do gene para formação do biofilme nas plantas submetidas ao choque térmico foi

significativa apenas nas 48 h após a inoculação, enquanto que para a proteína de choque frio, às 14 e 72h após a inoculação.

Figura 13. Expressão dos genes relacionados à (A) formação do biofilme (*hmsP*) e (B) proteínas de choque frio (*cspD*) da bactéria *Pantoea ananatis* em plantas de milho e submetidas a regimes de temperatura. * indica diferença entre médias comparadas pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade.



Biofilme se caracteriza por uma comunidade de bactérias na qual as células estão envolvidas em uma matriz de compostos poliméricos extracelulares e estão aderidas a uma superfície (BRANDA, FRIEDMAN, KOLTER, 2005). A formação de biofilme é importante para proteger as bactérias de condições adversas e desempenha papel crucial na infecção e colonização de superfícies. Os biofilmes também podem facilitar a troca de material genético entre as bactérias e cumprem função de resistência a antimicrobianos (BOGINO et al., 2013).

Além do biofilme, a adaptação das bactérias às condições ambientais desfavoráveis também auxilia na sobrevivência epifítica. Quando expostas às baixas temperaturas, bactérias produzem as conhecidas proteínas de choque frio, ou *cold shock protein*. Essas proteínas desempenham papel fundamental na manutenção da integridade das estruturas celulares e a estabilidade genômica de bactérias, permitindo-lhes manter a viabilidade e a funcionalidade celular mesmo em condições adversas (BERRY, FOEGEDING, 1997; KAUR, KHANNA, 2017; ZHANG, GROSS, 2021). Autores ainda relatam que proteínas de choque frio possam regular a expressão de genes de virulência de bactérias (WU et al., 2019; MUCHAAMBA, STEPHAN, TASARA, 2021; WEI, SAWYER, BURBANK, 2021).

As proteínas de choque frio assumem importante função na virulência de bactérias fitopatogênicas, como *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em plantas de arroz (WU et al., 2019); *Ralstonia solanacearum* em tabaco (LIU et al., 2020) e *Xylella fastidiosa* em uva (BURBANK, STENGER, 2016). De acordo com Wei, Sawyer, Burbank (2021), um homólogo de proteína de choque frio, *Csp1*, contribui para a fixação e sobrevivência em longo prazo e influencia a expressão gênica de *X. fastidiosa*. Em um mutante da bactéria com a deleção do gene *csp1*, os autores observaram redução da ligação célula a célula e redução da ligação às superfícies, além da ausência de pili e formação de biofilme. A estirpe Δ *csp1* também apresentou sobrevivência reduzida após crescimento *in vitro* a longo prazo.

Da mesma forma, a ausência da formação de biofilme em bactérias fitopatogênicas não interfere apenas na redução da defesa da bactéria, mas também na redução da virulência e migração, bem como em diminuição da capacidade de invasão e patogenicidade em plantas (MOHAN et al., 2018).

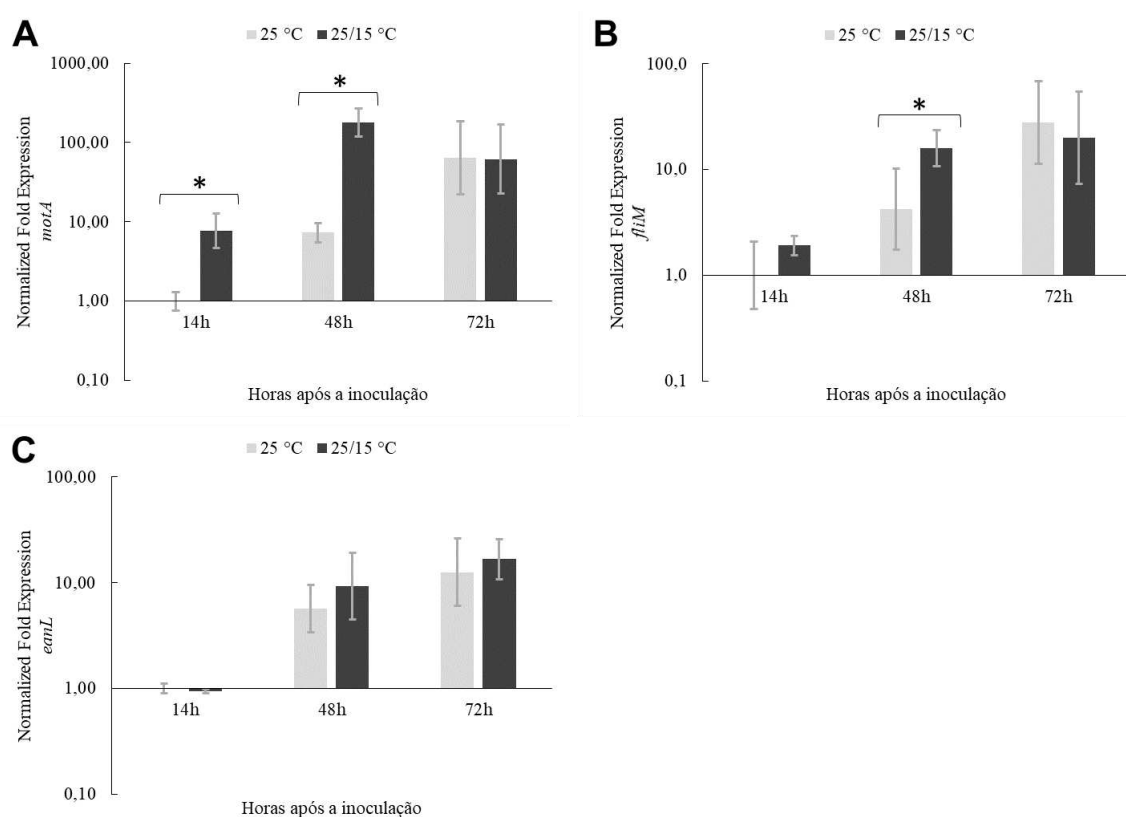
De acordo com Bogino et al. (2013), a autoagregação e o desenvolvimento de biofilme em muitas espécies bacterianas dependem de componentes da superfície bacteriana, como flagelos, lipopolissacarídeos (LPSs) e exopolissacarídeos, além da interação com o ambiente e a detecção de sinais de *quorum*. O *quorum sensing* desempenha papel fundamental em cada uma dessas etapas, regulando a expressão de genes envolvidos na adesão, produção de matriz extracelular e formação de estruturas tridimensionais (MOHAN et al., 2018).

Após a formação das microcolônias, a produção de sinais de detecção de *quorum* é necessária para a formação de um biofilme maduro, caracterizado por maior estabilidade e alcançado após um período significativo de crescimento e acumulação de biomassa. Os flagelos são necessários para que a comunidade do biofilme se aproxime e se mova pela superfície foliar (BELAS, 2014). A dispersão de biofilmes permite que as bactérias colonizem outras superfícies ou substratos, utilizando vias de motilidade e quimiotaxia para superar barreiras físicas e químicas até o apoplasto da planta (PFEILMEIER, CALY; MALONE, 2016).

Na análise das temperaturas e sua influência na expressão dos genes associados à motilidade bacteriana (*motA* e *fliM*), destaca-se um aumento significativo na expressão de *motA* nas plantas submetidas ao choque frio, já nas primeiras 14 horas após a inoculação. Notou-se uma variação ainda mais pronunciada entre os diferentes regimes de temperatura ao longo das 48 horas após a inoculação (Figura 15). A expressão de *motA*

nas plantas submetidas ao choque frio foi observada como sendo 24 vezes maior em comparação com aquelas mantidas a 25 °C. Adicionalmente, a expressão do gene *fliM* apresentou aumento de 4 vezes quando as plantas foram submetidas a baixas temperaturas, em comparação com a temperatura de 25 °C após 48 horas. Por outro lado, não foram identificadas diferenças significativas na expressão do gene *eanL*, responsável pela codificação de moléculas sinalizadoras do *quorum sensing* em *P. ananatis*.

Figura 14. Expressão dos genes relacionados à (A e B) motilidade (*motA* e *fliM*) e (C) *quorum sensing* (*eanL*) da bactéria *Pantoea ananatis* em plantas de milho e submetidas a regimes de temperatura. * indica diferença entre médias comparadas pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade.



Neste trabalho, o aumento significativo da expressão do gene de motilidade de *P. ananatis* em plantas submetidas ao choque térmico alinha-se com os resultados de Arvizu-Gómez et al. (2013). Os autores identificaram aumento de expressão dos genes relacionados à motilidade, produção de biofilme e ao sistema de secreção do tipo III em baixas temperaturas (18°C) em comparação com as temperaturas mais altas (28°C). Isso sugere que as baixas temperaturas influenciam diretamente a expressão desses genes, o que pode ter implicações significativas na fisiologia e no comportamento patogênico da

bactéria. Esta observação é válida para o presente estudo, uma vez que o aumento da motilidade de *P. ananatis* pode ser um fator para o aumento de severidade de lesões.

Neste estudo, mesmo que a temperatura não tenha exercido influência na expressão dos genes responsáveis pela produção de moléculas sinalizadoras do *quorum sensing*, destaca-se a relevância desse mecanismo no processo patogênico de bactérias fitopatogênicas. Ao atingirem uma densidade populacional adequada, as bactérias podem coordenar a ativação de fatores de virulência, resultando na capacidade de causar doenças nas plantas hospedeiras (ANTUNES et al., 2010; MOHAN et al., 2018). O sistema de *quorum* Eanl/R em *P. ananatis* regula ampla variedade de genes, abrangendo detecção redox, metabolismo, formação de flagelos, motilidade dependente de flagelos, adesão celular, formação de biofilme, reguladores, transporte, quimiotaxia, proteínas de aceitação de metila, proteínas de membrana, síntese de parede celular, resposta ao estresse e numerosas proteínas hipotéticas (SIBANDA et al., 2018).

Conforme destacado anteriormente, o aumento da motilidade de *P. ananatis* em milho sob a influência da queda de temperatura também é um importante fator no aumento da virulência da bactéria. Weller Stuart et al. (2016) destacaram que a ausência do gene *motA*, que confere motilidade flagelar, fez com que um isolado de *P. ananatis* perdesse a capacidade de causar sintomas em cebola. Os autores citam que o gene *motA* desempenha papel crucial na geração de torque, transportando prótons através da membrana celular, o que causa a rotação dos flagelos. No estudo em questão, o mutante com a deleção do gene *motA* foi flagelado, mas não móvel.

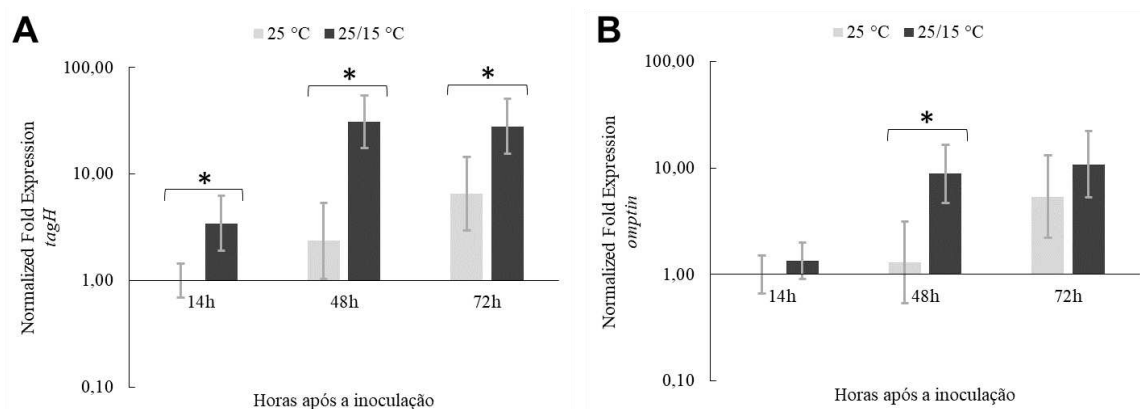
De forma concisa, a motilidade é essencial para a capacidade da bactéria de se mover e se espalhar, o que pode afetar sua capacidade de colonizar superfícies, formar biofilmes e infectar hospedeiros (WELLER-STUART et al., 2016). Portanto, após a fase de sobrevivência epifítica e de migração pela motilidade, os fitopatógenos devem adentrar o tecido vegetal, para então iniciar o processo de colonização. Uma vez dentro da planta, as bactérias empregam sistemas de secreção para liberar fitotoxinas e efetores proteicos, desempenhando diversas funções patogênicas (PFEILMEIER, CALY, MALONE, 2016).

De acordo com Shyntum et al. (2014), o sistema de secreção é um mecanismo utilizado por bactérias Gram-negativas para secretar proteínas para o exterior da célula ou para dentro de outras células, permitindo que as bactérias interajam com o ambiente e com outros organismos. Existem seis tipos de sistemas de secreção (T1SS a T6SS), cada um com características distintas em relação aos componentes estruturais, substratos e

mecanismos de exportação. O T6SS é o mais recentemente descrito e tem sido associado a processos de patogenicidade de *P. ananatis* e na interação com o hospedeiro.

O T6SS é composto por pelo menos 13 genes principais, além de vários elementos acessórios não conservados que codificam o "injectisome" do T6SS. O T6SS tem sido implicado em uma variedade de funções, incluindo formação de biofilme, invasão de células hospedeiras, citotoxicidade e sobrevivência em macrófagos (BINGLE et al., 2008; CASCALES, 2008). Neste estudo, observou-se aumento na expressão do gene responsável por codificar para um sistema de secreção tipo VI funcional (T6SS) em plantas submetidas ao choque frio, tanto às 14, 48 e 72 horas após a inoculação (Figura 16). A maior amplitude entre os tratamentos foi registrada nas 48 horas após a inoculação.

Figura 15. Expressão dos genes relacionados ao (A) Sistema de Secreção tipo VI (*tagH*) e (B) protease omptin (*omptin*) da bactéria *Pantoea ananatis* em plantas de milho e submetidas a regimes de temperatura. * indica diferença entre médias comparadas pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade.



As proteínas da família Omptin, que podem atuar como proteases, são encontradas em diversos patógenos bacterianos, tanto em organismos humanos quanto vegetais, desempenhando frequentemente importante função na virulência bacteriana (HRITONENKO, STATHOPOULOS, 2007). Segundo Holtapels, Nobel, Valcke (2016) várias características de virulência de *Erwinia amylovora* podem ser atribuídas proteínas da família Omptin. Além disso, as proteínas provam ser fatores importantes que determinam as diferenças na virulência entre os isolados, de outra forma consideradas homogêneas ao nível do genoma. Ressalta-se neste estudo a importância da redução de temperatura na maior expressão do gene que codifica para a proteína Omptin, podendo

estar relacionada com o aumento de virulência da bactéria e na maior severidade da doença na cultura do milho.

Neste estudo, foi constatada a influência do choque térmico na maior expressão de genes associados a todas as fases do processo de patogênese bacteriana, exceto *quorum sensing*. De acordo com Smirnova (2001), algumas bactérias fitopatogênicas, mesmo com crescimento ideal entre 25 a 30 °C, apresentam aumento de expressão de genes de virulência quando em temperaturas mais baixas, entre 16 a 24 °C. Os autores apontam que a explicação ecológica para esse fenômeno ainda não está totalmente esclarecida, indicando que o aumento da virulência em temperaturas mais baixas pode estar associado ao fato de que a maioria das bactérias fitopatogênicas consome menos energia nessas condições, possibilitando a alocação de recursos adicionais para a expressão de genes de virulência e a produção de proteínas relacionadas à patogenicidade.

3.6 CONCLUSÃO

Este estudo destaca a influência da baixa temperatura na virulência de *P. ananatis* em milho, interferindo nas interações patógeno-hospedeiro. É o primeiro estudo a demonstrar o rápido aumento populacional de *P. ananatis* após choque térmico em baixas temperaturas, além da maior severidade de lesões e a expressão diferencial de genes de virulência.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo revela diversidade dentro da espécie *Pantoea ananatis* a respeito da presença do gene de nucleação de gelo *inaA*. Neste estudo, o gene não demonstrou ser essencial para a patogênese. Entretanto, novos estudos devem ser elaborados a fim de identificar quão importante é a presença do gene *inaA* em *P. ananatis* para o desenvolvimento de lesões em milho, assim como a influência da temperatura na sua regulação.

Por outro lado, os resultados evidenciaram que temperaturas baixas influenciaram no aumento populacional da bactéria, no aumento da severidade das lesões em plantas de milho e no aumento da expressão diferencial dos principais genes de virulência de *P. ananatis* em milho.

Estes resultados possibilitam melhor entendimento acerca da influência do ambiente no processo de interação entre a bactéria *P. ananatis* e a cultura do milho. Portanto, a investigação do impacto das condições meteorológicas nas interações entre *P. ananatis* e suas plantas hospedeiras, considerando não apenas as baixas temperaturas, mas também outros fatores ambientais, devem ser analisados.

Informações geradas por pesquisas como esta criam oportunidades de desenvolver estratégias de manejo para a mancha branca do milho. Essas medidas de manejo, como práticas culturais e a utilização de agentes biológicos, devem considerar a influência da temperatura na virulência da bactéria, o que possibilitará maior chance de sucesso.

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, n. 2, p. 297-300, 1989.
- ABDEL-GAIED, T. G.; ABD-EL-KHAIR, H.; YOUSSEF, M. M.; EL-MAATY, S. A.; MIKHAIL, M. S. First report of strawberry bacterial leaf blight caused by *Pantoea ananatis* in Egypt. **Journal of Plant Protection Research**, v. 62, n. 2, p. 207-214, 2022.
- ALIPPI, A. M.; LÓPEZ, A. C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. **Plant Disease**, v. 94, n. 4, p. 487-487, 2010.
- 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.
- ANTUNES, L. C. M.; FERREIRA, R. B.; BUCKNER, M. M.; FINLAY, B. B. Quorum sensing in bacterial virulence. **Microbiology**, v. 156, n. 8, p. 2271-2282, 2010.
- ARAKI, T. An analysis of the effect of changes in growth temperature on proteolysis in vivo in the psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ANT-300. **Microbiology**, v. 138, n. 10, p. 2075-2082, 1992.
- ARVIZU-GÓMEZ, J. L.; HERNÁNDEZ-MORALES, A.; AGUILAR, J. R. P.; ÁLVAREZ-MORALES, A. Transcriptional profile of *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 at low temperature: **Physiology of Phytopathogenic Bacteria**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2013.
- 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.
- BELAS, R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 9, p. 517–527, 2014. doi:10.1016/j.tim.2014.05.002
- BERGER, F.; MORELLET, N.; MENU, F.; POTIER, P. Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 11, p. 2999-3007, 1996.
- BERRY, E. D.; FOEGEDING, P. M. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 12, p. 1583-1594, 1997.
- BINGLE, L. E. H.; BAILEY, C. M.; PALLAN, M. J. Type VI secretion: A beginner's guide. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 3-8, 2008.

- BOGINO, P. C.; DE LAS MERCEDES OLIVA, M.; SORROCHE, F. G.; GIORDANO, W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15838-15859, 2013.
- 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.
- BORSOI, F. T.; SCHMITZ, L.; WORDELL FILHO, J. A.; NESI, C. N. Mancha branca no milho: etiologia e controle. **Agropecuária Catarinense**, v. 31, n. 3, p. 31-34, 2018.
- BRANDA, S.S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: The matrix revisited. **Trends Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20–26, 2005.
- BRANNON, J. R.; BURK, D. L.; LECLERC, J. M.; THOMASSIN, J. L.; PORTT, A.; BERGHUIS, A. M.; LE MOUAL, H. Inhibition of outer membrane proteases of the omptin family by aprotinin. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 6, p. 2300-2311, 2015.
- BURBANK, L. P.; STENGER, D. C. A temperature-independent cold-shock protein homolog acts as a virulence factor in *Xylella fastidiosa*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 5, p. 335-344, 2016.
- CARR, E. A.; BONASERA, J. M.; ZAID, A. M.; LORBEER, J. W.; BEER, S. V. First report of bulb disease of onion caused by *Pantoea ananatis* in New York. **Plant Disease**, v. 94, n. 7, 916-916, 2010.
- CARSON, M. L.; STUBER, C. W.; SENIOR, M. L. Quantitative trait loci conditioning resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize caused by *Phaeosphaeria maydis*. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p.571–574, 2005. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0571>
- CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 427-439, 2006.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17–24, 2003.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. A. Doenças na Cultura do Milho. Circular Técnica 83, Embrapa, Sete Lagoas, MG. 2006.
- CASCALES, E. The type VI secretion toolkit. **EMBO Reports**, v. 9, n.8, p. 735-741, 2008.
- CERVELATTI, E. P.; PAIVA, E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; TEIXEIRA, F. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of

Phaeosphaeria leaf spot in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n. 3, p. 30-37, 2002.

CHATTOPADHYAY, M. K. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. **Journal of Biosciences**, v. 31, p. 157-165, 2006.

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.

COLEGRAVE, N.; RUXTON, G. D. Confidence intervals are a more useful complement to nonsignificant tests than power calculations. **Behavioral Ecology**, v. 14, n. 3, p. 446-447, 2003. DOI: 10.1093/beheco/14.3.446.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira. Safra 2022/2023** – Décimo segundo levantamento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 10 out. 2023a.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Série histórica das Safras de Milho**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/910-Milho>. Acesso em: 10 out. 2023b.

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; LANZA, F. E. **Recomendações para o controle químico da mancha branca do milho**. Embrapa, Sete Lagoas-MG. Circular Técnica 167, 2011.

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; LANZA, F. E.; FIGUEIREDO, J. E. F. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha branca do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n.3, p. 291-301, 2012.

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; FIGUEIREDO, J. E. F.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; LANZA, F. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. **Variáveis epidemiológicas associadas à Mancha Branca do milho**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 84, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, 2013.

COTA, L. V.; COSTA, R. V.; SABATO, E. O.; SILVA, D. D. **Histórico e perspectivas das doenças na cultura do milho**. Embrapa, Sete Lagoas-MG. Circular Técnica 193, 2013.

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, n. 1, p. 20-25, 2002.

DERZELLE, S.; HALLET, B.; FERAIN, T.; DELCOUR, J.; HOLS, P. Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4285-4290, 2003.

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, n. 11, p.2936–2937, 2010.

DENNY, T.P. Testing pathogenicity. In: WILLIAMS, P., KETLEY, J., SALMOND, G. **Bacterial pathogenesis: methods in microbiology**. London: Academic Press, v.27, p.129-137, 1995.

DIARD, M.; HARDT, W. Evolution of bacterial virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 5, p. 679-697, 2017.

ESCANFERLA, M. E.; WYSMIERSKI, P. T.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Crescimento, viabilidade e disseminação da bactéria *Pantoea ananatis*, agente causal da doença Mancha Branca do Milho. **Anais...** Congresso Nacional de Milho e Sorgo, v. 26, 2006.

ESCANFERLA, M.; WYSMIERSKI, P.; MEIRELLES, W.; MEIRELLES, L. Viability and dissemination of *Pantoea ananatis*, etiological agent of Maize White Spot disease. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 52, 2018.

FARRELL, J.; ROSE, A. H. Cold shock in a mesophilic and a psychrophilic *Pseudomonad*. **Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 429-439, 1968.

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

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. D. **Principais doenças na cultura do milho**. Embrapa-CNPMS. Circular técnica 26, 82p., 2000.

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, Brasília. **Anais...** Brasília, p.309, 1995.

FERNANDES, R. H.; ROSA, V. C. S.; LIMA, D. Formulações de mancozebe no controle da mancha branca no milho. **Anuário de Pesquisas Agricultura**, p. 170-176, 2020.

FIGUEIREDO, J. E. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Simple, rapid and accurate PCR-based detection of *Pantoea ananatis* in maize, sorghum and *Digitaria* sp. **Journal of Plant Pathology**, v.94, n. 3, p. 663-667, 2012.

FOYER, C. H.; VANACKER, H.; GOMEZ, L. D.; HARBINSON, J. Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 6-8, p. 659-668, 2002.

GASSER, F.; CARDINALE, M.; SCHILDBERGER, B.; BERG, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by successful introduction of *Pantoea ananatis* in the grapevine phyllosphere. **International Journal of Wine Research**, v. 4, p. 53-63, 2012

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.

GOERING, R.; LARSEN, S.; TAN, J.; WHELAN, J.; MAKAREVITCH, I. QTL mapping of seedling tolerance to exposure to low temperature in the maize IBM RIL population. **Plos One**, v. 16, n. 7, 2021.

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.; MOLOTO, V. M.; VENTER, S. N.; COUTINHO, T. A. Isolation and identification of *Pantoea ananatis* from onion seed in South Africa. **Seed Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 655-668, 2006.

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

GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M.A. Some like it cold: Response of microorganisms to cold shock. **Archives of Microbiology**, v. 166, p. 293–300. 1996.

GRAUMANN, P.; WENDRICH, T. M.; WEBER, M. H.; SCHRÖDER, K.; MARAHIEL, M. A. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. **Molecular Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 741-756, 1997.

GROSS, D. C.; CODY, Y. S.; PROEBSTING JR, E. L.; RADAMAKER, G. K.; SPOTTS, R. A. Distribution, population dynamics, and characteristics of ice nucleation-active bacteria in deciduous fruit tree orchards. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1370-1379, 1983.

GUETTER, A. K.; ZAICOVSKI, M. B. Climatologia de geadas do Paraná. In XI Congresso Brasileiro de Meteorologia, Rio de Janeiro. **Anais...**, Sociedade Brasileira de Meteorologia, p. 1148-1155, 2000.

HAEFELE, D. M.; LINDOW, S. E. Flagellar motility confers epiphytic fitness advantages upon *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 10, pág. 2528-2533, 1987.

HAIKO, J. LAAKKONEN, L.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B.; KORHONEN, T. K. Molecular adaptation of a plant-bacterium outer membrane protease towards plague virulence factor Pla. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2011.

HAIKO, J.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. **Biology**, v. 2, n. 4, p. 1242-1267, 2013.

HÉBRAUD, M.; DUBOIS, E.; POTIER, P.; LABADIE, J. Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 13, p. 4017-4024, 1994.

HÉBRAUD, M.; POTIER, P. Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 211-219, 1999.

HOLTAPPELS, M.; NOBEN, J. P.; VALCKE, R. Virulence of *Erwinia amylovora*, a prevalent apple pathogen: Outer membrane proteins and type III secreted effectors increase fitness and compromise plant defenses. **Proteomics**, v. 16, n. 17, p. 2377-2390, 2016.

HRITONENKO, V.; STATHOPOULOS, C. OmpT proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative Enterobacteriaceae. **Molecular Membrane Biology**, v. 24, n. 5-6, p. 395-406, 2007.

IDR-PR. **Dados Meteorológicos Históricos e Atuais**. 2024. Disponível em: <https://www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Dados-Meteorologicos-Historicos-e-Atuais>

KADO, C. I. **Plant bacteriology**. St. Paul, MN: American Phytopathological Society. 336 p., 2010.

KAUR, J.; KHANNA, V. Bacterial Adaptation to Cold. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 11, p. 628-635, 2017.

KAWAHARA, H.; MATSUSHITA, M.; YAMADE, K.; OBATA, H. The control of the production and secretion of extracellular ice-nucleating material of *Erwinia uredovora* KUIN-3. **Biocontrol Science**, v. 4, n. 1, p. 9-16, 1999.

KIDO, K.; ADACHI, R.; HASEGAWA, M.; YANO, K.; HIKICHI, Y.; TAKEUCHI, S.; ATSUCHI, T.; TAKIKAWA, Y. Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, n. 4, p. 302-312, 2008.

KIM, S. N.; CHO, W. K.; KIM, W. I.; JEE, H. J.; PARK, C. S. Growth promotion of pepper plants by *Pantoea ananatis* B1-9 and its efficient endophytic colonization capacity in plant tissues. **The Plant Pathology Journal**, v. 28, n. 3, p. 270-281, 2012a.

KIM, H. J.; LEE, J. H.; KANG, B. R.; RONG, X.; MCSPADDEN GARDENER, B. B.; JI, H. J.; KIM, Y. C. Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* B1-9, a nonpathogenic plant growth-promoting bacterium. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 729, 2012b.

KIM, I.; GRODZKI, L.; CARAMORI, P. H.; VISSOTO, S. Análise da ocorrência de geadas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 11, n. 1, p. 99-106, 2003.

KIM, H. K.; ORSER, C.; LINDOW, S. E.; SANDS, D. C. *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice nucleation. **Plant Disease**, v. 71, n. 11, p. 994-997, 1987.

KINI, K.; AGNIMONHAN, R.; AFOLABI, O.; MILAN, B.; SOGLONOU, B.; GBOGBO, V.; SILUÉ, D. First report of a new bacterial leaf blight of rice caused by *Pantoea ananatis* and *Pantoea stewartii* in Benin. **Plant Disease**, v. 101, n. 1, p. 242-242, 2017.

KLEMENT, Z. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. **Nature**, v. 199, n. 4890, p. 299-300, 1963.

KLEMENT, Z.; GOODMAN, R. N. Hypersensitive reaction in plants infected by bacterial pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 5, p. 17-44, 1967.

KONKEL, M. E.; TILLY, K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 2, p. 157-166, 2000.

KOUBA, V.; GERLEIN, J. C.; BENAKOVA, A.; LOPEZ MARIN, M. A.; RYSAVA, E.; VEJMEJKOVA, D.; BARTACEK, J. Adaptation of flocculent anammox culture to low temperature by cold shock: long-term response of the microbial population. **Environmental Technology**, v. 43, n. 28, p. 4403-4410, 2022.

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.

KRAWCZYK, K.; WIELKOPOLAN, B.; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. *Pantoea ananatis*, a new bacterial pathogen affecting wheat plants (*Triticum* L.) in Poland. **Pathogens**, v. 9, n.12, p. 1079, 2020.

LANA, U. G. P.; SOUZA, I. R. P.; NODA, R. W.; PASTINA, M. M.; MAGALHÃES, J. V.; GUIMARÃES, C. T. Quantitative trait loci and resistance gene analogs associated with maize white spot resistance. **Plant Disease**, v. 101, p. 200–208, 2017.

LIN, Y., ZHANG, C., LAN, H., GAO, S., LIU, H., LIU, J; ZHANG, S. Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. **PloS One**, v. 9, n. 5, 2014.

LINDOW, S. E.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 831-838, 1978a.

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, n. 3, p. 523-527, 1978b.

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

LINDOW, S. E. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by ice *Pseudomonas syringae* mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2520-2527, 1987.

LIU, Y.; TAN, X.; CHENG, H.; GONG, J.; ZHANG, Y.; WANG, D.; DING, W. The cold shock family gene *cspD3* is involved in the pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* CQPS-1 to tobacco. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods** **25**, p. 402–408, 2001. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

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

LU, L.; CHANG, M.; HAN, X.; WANG, Q.; WANG, J.; YANG, H.; DAI, S. Beneficial effects of endophytic *Pantoea ananatis* with ability to promote rice growth under saline stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 4, p. 1919-1931, 2021.

JEONG, H. H., JEONG, S. G., PARK, A., JANG, S. C., HONG, S. G., & LEE, C. S. Effect of temperature on biofilm formation by Antarctic marine bacteria in a microfluidic device. **Analytical Biochemistry**, v. 446, p. 90-95, 2014.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L. Bacterial Growth. In: **Environmental Microbiology**, Academic Press, 2015. p. 37-56. doi:10.1016/b978-0-12-394626-3.00003-x

MAMEDE, M. C.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho. **Summa Phytopathologica**, v. 46, n. 1, p. 36-40, 2020.

MANSILLA, M. C.; DE MENDOZA, D. Regulation of membrane lipid homeostasis in bacteria upon temperature change. **Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Springer International Publishing, Cham, p. 775-786, 2019.

MEGÍAS, E.; REIS JUNIOR, F. B.; RIBEIRO, R. A.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Genome Sequence of *Pantoea ananatis* Strain AMG 501, a Plant Growth-Promoting Bacterium Isolated from Rice Leaves Grown in Paddies of Southern Spain. **Genome Announcements**, v. 5, n. 34, 2017.

MELOTTO, M.; KUNKEL, B. N. Virulence strategies of plant pathogenic bacteria. In: **The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 61-82, 2013.

MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; KERSTERS, K. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the Genus *Pantoea* emend. As *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb.

nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 1, p. 162-173, 1993.

MESQUINI, R. M.; MATTOS, A. D. P.; RISSATO, B. B.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Progresso temporal de doenças da cultura do milho. **Summa Phytopathologica**, v. 46, n. 2, p. 140-144, 2020.

MILLER, A. M.; FIGUEIREDO, J. E. F.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; PACOLA-MEIRELLES, L. D. Characterization of the *inaA* gene and expression of ice nucleation phenotype in *Pantoea ananatis* isolates from Maize White Spot disease. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n. 1, 2016.

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

MILLER, W. G.; M. T. BRANDL; B. QUIÑONES; S. E. LINDOW. Biological sensor for sucrose availability: relative sensitivities of various reporter genes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 1308-1317, 2001.

MOHAN, R.; BENTON, M.; DANGELMAIER, E.; FU, Z.; CHANDRA SEKHAR, A. Quorum sensing and biofilm formation in pathogenic and mutualistic plant-bacterial interactions. **Implication of quorum sensing system in biofilm formation and virulence**, p. 133-160, 2018. doi:10.1007/978-981-13-2429-1_9

MONDAL, C.; MANI, J.; SINGH, J.; KIM, G.; MUDGETT, M. B. A New Leaf Blight of Rice Caused by *Pantoea ananatis* in India. **Plant Disease**, v. 95, n. 12, p. 1582-1582, 2011.

MORITA, R. Y. Psychrophilic bacteria. **Bacteriological Reviews**, Washington D.C., v. 39, n. 2, p. 145-167, 1975.

MOROHOSHI, T.; NAKAMURA, Y.; YAMAZAKI, G.; ISHIDA, A.; KATO, N.; IKEDA, T. The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces N-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8333-8338, 2007.

MUCHAAMBA, F.; STEPHAN, R.; TASARA, T. *Listeria monocytogenes* cold shock proteins: small proteins with a huge impact. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1061, 2021.

MUKHERJEE, S.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 371-382, 2019.

NASTARI, P. M. **Etanol de milho tem futuro no Brasil**. Agroanalysis, abr. 2018. Disponível em: <http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/agroanalysis/article/viewFile/78264/74963>.

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.

OBATA, H.; TAKINAMI, K.; TANISHITA, J.; HASEGAWA, Y.; KAWATE, S.; TOKUYAMA, T.; UENO, T. Identification of a new ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 54, p. 725– 730, 1990.

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

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MEIRELLES, W. F.; PARENTONI, S. N.; MARRIEL, I. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Reaction of maize inbred lines to the bacterium *Pantoea ananatis* isolated from Phaeosphaeria leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 4, 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.

PANAGOPOULOS, C. G.; CROSSE, J. E. Frost injury as a predisposing factor in blossom blight of pear caused by *Pseudomonas syringae* van Hall. **Nature**, v. 202, n. 4939, p. 1352-1352, 1964.

PARENTONI, S. N.; FERNANDES, F. T.; MAGNAVACA, R.; GAMA, E. E. G.; CASELA, C. R.; LOPES, M. A; OLIVEIRA, A. Avaliação de cruzamentos dialélicos para tolerância a *Phyllosticta* sp. em milho. In **Embrapa Milho e Sorgo-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 20., 1994, Goiânia. Centro-Oeste: cinturão do milho e do sorgo no Brasil: resumos. Sete Lagoas: ABMS, 1994. p. 18, 1994.

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.

PÉREZ-Y-TERRÓN, R.; VILLEGAS, M. C.; CUELLAR, A.; MUÑOZ-ROJAS, J.; CASTAÑEDA-LUCIO, M.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; ... FUENTES-RAMÍREZ, L. E. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 4, n. 1, p. 96-99, 2009.

PFEILMEIER, S.; CALY, D. L.; MALONE, J. G. Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective: challenges in bacterial molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 8, p. 1298-1313, 2016.

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.

RAY, M.K. Cold-stress response of low temperature adapted bacteria. In: SREEDHAR, A.S.; SRINIVAS, U.K. **Stress Response: A Molecular Biology Approach**. India: Research Singpost, 2006. ISBN 81-308-0109-4.

RIJAVEC, T.; LAPANJE, A.; DERMASTIA, M.; RUPNIK, M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 802-808, 2007.

ROBERTS, M. E.; INNIS, W. E. The synthesis of cold shock proteins and cold acclimation proteins in the psychrophilic bacterium *Aquaspirillum arcticum*. **Current Microbiology**, v. 25, p. 275-278, 1992.

ROCHA, K. R.; ANDRADE-NOBREGA, G. M.; FIGUEIREDO, J. E. F.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Caracterização comparativa entre isolados de *Pantoea ananatis* oriundos de lesões de capim-colchão com aqueles de lesões da mancha branca do milho. **Anais... XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, p. 701-708, 2010.

ROCHA, K. R.; MEIRELLES, W. F.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A.; SANTANA, T. T.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Atividade de nucleação de gelo e densidade populacional do patógeno podem ser fatores que contribuem para o progresso da doença mancha branca do milho. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 22, n. 4, 2019.

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

ROWBURY, R. J. Temperature effects on biological systems: introduction. **Science Progress**, v. 86, n. 1-2, p. 1-8, 2003.

SAUER, A. V.; ROCHA, K. R.; DOS SANTOS PEDRO, E.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Ice nucleation activity in *Pantoea ananatis* obtained from maize white spot lesions. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p.1659-1666, 2014.

SAUER, A. V.; ROCHA, K. R.; GONÇALVES, R. M.; MEIRELLES, W. F.; FIGUEIREDO, J. E. F.; MARRIEL, I. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Survival of *Pantoea ananatis*, causal agent of maize white spot disease in crop debris. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 1, p. 21-24, 2015.

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.

SENAR, **Milho invade as indústrias de produção de etanol**. 18 de outubro de 2023. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/milho-invade-as-industrias-de-producao-de-etanol>.

- SERRANO, F. B. Bacterial fruitlet brown-rot of pineapple in the Philippines. **Philippine Journal Science**, v. 36, n. 3, p. 271–324, 1928.
- SIBANDA, S., THERON, J., SHYNTUM, D. Y., MOLELEKI, L. N., & COUTINHO, T. A. Characterization of two LuxI/R homologs in *Pantoea ananatis* LMG 2665T. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 893-903, 2016.
- SIBANDA, S.; KWENDA, S.; TANUI, C. K.; SHYNTUM, D. Y.; COUTINHO, T. A.; MOLELEKI, L. N. Transcriptome profiling reveals the EanI/R quorum sensing regulon in *Pantoea ananatis* LMG 2665T. **Genes**, v. 9, n. 3, p. 148, 2018.
- SILVA, J. F.; BARBOSA, R. R.; DE SOUZA, A. N.; DA MOTTA, O. V.; TEIXEIRA, G. N.; CARVALHO, V. S.; DE SOUZA FILHO, G. A. Isolation of *Pantoea ananatis* from sugarcane and characterization of its potential for plant growth promotion. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 15301-15311, 2015.
- SHIN, G. Y.; SCHACHTERLE, J. K.; SHYNTUM, D. Y.; MOLELEKI, L. N.; COUTINHO, T. A.; SUNDIN, G. W. Functional characterization of a global virulence regulator Hfq and identification of Hfq-dependent sRNAs in the plant pathogen *Pantoea ananatis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2075, 2019.
- SHIVAJI, S.; PRAKASH, J. S. S. How do bacteria sense and respond to low temperature? **Archives of Microbiology**, v. 192, p. 85-95, 2010.
- SHYNTUM, D. Y.; VENTER, S. N.; MOLELEKI, L. N.; TOTH, I.; COUTINHO, T. A. Comparative genomics of type VI secretion systems in strains of *Pantoea ananatis* from different environments. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2014.
- SHYNTUM, D. Y.; THERON, J.; VENTER, S. N.; MOLELEKI, L. N.; TOTH, I. K.; COUTINHO, T. A. *Pantoea ananatis* utilizes a type VI secretion system for pathogenesis and bacterial competition. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 4, p. 420-431, 2015.
- SMIRNOVA, A.; LI, H.; WEINGART, H.; AUFHAMMER, S.; BURSE, A.; FINIS, K.; SCHENK, A.; ULLRICH, M. S. Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 176, p. 393-399, 2001.
- SUMAN, A.; SHUKLA, L.; MARAG, P. S.; VERMA, P.; GOND, S.; PRASAD, J. S. Potential use of plant colonizing *Pantoea* as generic plant growth promoting bacteria for cereal crops. **Journal of Environmental Biology**, v. 41, n. 5, p. 987-994, 2020.
- TABRAIZ, S.; PETROPOULOS, E.; SHAMURAD, B.; QUINTELA-BALUJA, M.; MOHAPATRA, S.; ACHARYA, K.; CHARLTON, A.; DAVENPORT, R. J.; DOLFING, J.; SALLIS, P. J. Temperature and immigration effects on quorum sensing in the biofilms of anaerobic membrane bioreactors. **Journal of Environmental Management**, v. 293, p. 112947, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112947>
- TAKLE, G. W.; TOTH, I. K.; BRURBERG, M. B. Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-9 2007.

TANS-KERSTEN, J.; HUANG, H.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 12, p. 3597-3605, 2001.

THOMAS, S.B.; THOMAS, B.F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk – Part 1. **Dairy Industries**, v. 38, n. 1, p. 11-15, 1973.

TORRES, R.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; ABADIAS, M.; VIÑAS, I. Post-harvest control of *Penicillium expansum* on pome fruits by the bacterium *Pantoea ananatis* CPA-3. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 75–81, 2005. doi:10.1080/14620316.2005.1151189

TRÜPER, H. G.; DE'CLARI, L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition'. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47, n. 3, p. 908-909, 1997.

ULLRICH, M.; SMIRNOVA, A.; WANG, L.; LI, H.; WEINGART, H.; BURSE, A.; BUDDE, I. Temperature-Mediated Differential Gene Expression in Plant Pathogenic Bacteria. In: **Plant Pathogenic Bacteria: Proceedings of the 10th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, July 23–27, 2000 (pp. 97-99), 2001.

UMESHA, S.; RICHARDSON, P.A.; KONG, P.; HONG, C.X. A novel indicator plant to test the hypersensitivity of phytopathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p. 95-97, 2008.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Grain and Feed Annual**: Report Number: BR2022-0021. 12 abril. 2022. Disponível em: usda.gov

VIGH, L. A. S. Z. L.; LOS, D. A.; HORVATH, I.; MURATA, N. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desA gene in *Synechocystis* PCC6803. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n.19, p. 9090-9094, 1993.

VIRTANEN, J.-P.; KETO-TIMONEN, R.; JAAKKOLA, K.; SALIN, N.; KORKEALA, H. Changes in transcriptome of *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 grown at 3 °C and 28 °C detected by RNA sequencing shed light on cold adaptation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 416, 2018.

XING, E.; FAN, X.; JIANG, F.; ZHANG, Y. Advancements in Research on Prevention and Control Strategies for Maize White Spot Disease. **Genes**, v. 14, n. 11, p. 2061, 2023.

XUE, Y., HU, M., CHEN, S., HU, A., LI, S., HAN, H.; LU, G.; ZENG, L.; ZHOU, J. *Enterobacter asburiae* and *Pantoea ananatis* causing rice bacterial blight in China. **Plant Disease**, v. 105, n. 8, p. 2078-2088, 2021.

WEBER, M. H. W.; MARAHIEL, M. A. Bacterial cold shock responses. **Science Progress**, v. 86, n. 1-2, p. 9-75, 2003.

WELLER-STUART, T.; TOTH, I.; DE MAAYER, P.; COUTINHO, T. Swimming and twitching motility are essential for attachment and virulence of *Pantoea ananatis* in onion seedlings. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 5, p. 734-745, 2016.

WELLER-STUART, T.; DE MAAYER, P.; COUTINHO, T. *Pantoea ananatis*: genomic insights into a versatile pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.18, n. 9, p. 1191-1198, 2017.

WEI, W.; SAWYER, T.; BURBANK, L. Csp1, a cold shock protein homolog in *Xylella fastidiosa* influences cell attachment, pili formation, and gene expression. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, p. e01591-21, 2021.

WEINER, R.; LANGILLE, S.; QUINTERO, E. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. **Journal of Industrial Microbiology**, v.15, p.339-346, 1995.

WILLEMS, E.; LEYNS, L.; VANDESOMPELE, J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. **Analytical Biochemistry**, v. 379, n. 1, p. 127–129, 2008. doi:10.1016/j.ab.2008.04.036.

WHYTE, L. G.; INNIS, W. E. Transformation of a psychrotrophic bacterium with a plasmid from a mesophile. **Current Microbiology**, v. 25, p. 331-334, 1992.

WOLFFE, A. P. The cold-shock response in bacteria. **Science Progress**, v. 78, p. 301-310, 1995.

WU, L.; MA, L.; LI, X.; HUANG, Z.; GAO, X. Contribution of the cold shock protein CspA to virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 3, p. 382-391, 2019.

WU, Z.; KAN, F. W. K.; SHE, Y. M.; WALKER, V. K. Biofilm, ice recrystallization inhibition and freeze-thaw protection in an epiphyte community. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, p. 363-370, 2012.

YARYURA, P. M.; CONFORTE, V. P.; MALAMUD, F.; ROESCHLIN, R.; DE PINO, V.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A. XbmR, a new transcription factor involved in the regulation of chemotaxis, biofilm formation and virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4164-4176, 2015.

ZHANG, Y.; GROSS, C. A. Cold shock response in bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 55, p. 377-400, 2021.

ZHAO, X.; GAO, L.; HUANG, H.; ZHAO, Y.; HANIF, A.; WU, H.; GAO, X. Exploring the pathogenic function of *Pantoea ananatis* endogenous plasmid by an efficient and simple plasmid elimination strategy. **Microbiological Research**, v. 246, 2021.

ZHENG, J., YU, J., JIA, M., ZHENG, L., & FENG, Y. Indole enhances the survival of *Pantoea ananatis* YJ76 in face of starvation conditions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 633-639, 2017.

ZHOU, Z.; TANG, H.; WANG, W.; ZHANG, L.; SU, F.; WU, Y.; XU, P. A cold shock protein promotes high-temperature microbial growth through binding to diverse RNA species. **Cell Discovery**, v. 7, n. 1, p. 15, 2021.