



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALINE VANESSA SAUER

**MONITORAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO
EPIFÍTICA DE *Pantoea ananatis*, AGENTE CAUSAL DA
MANCHA BRANCA DO MILHO**

Londrina
2010

ALINE VANESSA SAUER

**MONITORAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO
EPIFÍTICA DE *Pantoea ananatis*, AGENTE CAUSAL DA
MANCHA BRANCA DO MILHO**

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

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

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S255m Sauer, Aline Vanessa.

Monitoramento e caracterização da população epifítica de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho / Aline Vanessa Sauer. – Londrina, 2010.
79 f. : il.

Orientador: Luzia Doretto Paccola-Meirelles.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Milho – Doenças e pragas – Teses. 2. Bactérias fitopatogênicas – Teses. 3. Bactérias – Efeito da temperatura – Teses. I. Paccola-Meirelles, Luzia Doretto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 632.35:633.15

ALINE VANESSA SAUER

**MONITORAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO
EPIFÍTICA DE *Pantoea ananatis*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA
BRANCA DO MILHO**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Junior
(ESALQ)

Prof. Dr. Laurival Vilas Boas (UEL)

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira (UEL)

Dr. Ivanildo Evodio Marriel
(Embrapa Milho e Sorgo)

Profa. Dra. Luzia Doretto Paccola-Meirelles
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 26 de fevereiro de 2010.

Aos meus pais Ivone e João Vanderlei, meus irmãos Juninho e Bruninho,
por todo amor, dedicação exemplar e incansável para a minha realização e felicidade!

À minha amiga Simira Pulpor Muramoto (in memorian),
por toda sua força, apoio, doação, imenso companheirismo, e principalmente todo amor,
dedicação e amizade, e exemplo de vida deixado a mim.

DEDICO!

À Jesus Cristo, meu Mestre e meu Eterno Amor,

OFEREÇO!

AGRADECIMENTOS

À Jesus Cristo, por conduzir meus passos em todos os momentos e por haver me preparado tantos presentes e lindas surpresas durante estes três anos de mestrado.

À Deus e ao Divino Espírito Santo, pela força, pela doce e constante presença em todos os momentos de alegrias, resultados positivos e dificuldades.

À Prof. Dra. Luzia Doretto Paccola-Meirelles, pela competente e exemplar orientação, pelos ensinamentos transmitidos, dedicação, por todo carinho e amizade.

Ao pesquisador Dr. Walter F. Meirelles, Embrapa Milho e Sorgo, pela contribuição na condução prática deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Jr., pelas parcerias e confiança.

Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo: Dr. Ivanildo E. Marriel e Dr. José Edson Figueiredo pela contribuição nas análises de BIOLOG e análises moleculares deste trabalho.

À Prof. Dra. Célia Andrade, Juca San Martin e Vanessa Veronese Ortunho, Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina, pela permissão no uso do microscópio eletrônico de transmissão e pela contribuição nas análises.

Ao pesquisador Dr. Nelson Fonseca, Iapar, pela contribuição nas análises estatísticas deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa e concessão da bolsa.

À Sra. Carlota Renzi Meneghel por seu amor, apoio e incentivo na minha vida estudantil e profissional. Serei lhe eternamente grata por acreditar em mim.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos: Aquilino Portera, Daiane Lopes, Magali Regina, Mayara Fernanda, Kátia Real, Paulo Fernando, Eliseu Pedro e Rafaela Mie, Viviane Baba, pela companhia em todos os momentos e suas

diversidades, por toda contribuição sem a qual a conclusão deste trabalho seria mais árdua.

À Universidade Estadual de Londrina e ao programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias, por permitirem a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Universidade Estadual de Londrina, em especial ao amigo Ideval, pelo companheirismo e amizade.

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

À todos os amigos de mestrado, representados aqui por João Miguel F. Ruas e Andreia Faria Macena pela amizade de anos.

SAUER, Aline Vanessa. **Monitoramento e caracterização da população epifítica de *Pantoea ananatis*, agente causal da Mancha Branca do Milho.** 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A bactéria *Pantoea ananatis*, foi descrita recentemente como sendo agente causal da Mancha Branca do Milho. Os sintomas caracterizam-se inicialmente por lesões iniciais cloróticas aquosas, que se tornam necróticas de coloração palha. Este trabalho teve como objetivo, monitorar a população epifítica da bactéria, sob condições naturais de infestação e caracterizar essas bactérias comparando-as com aquelas presentes nas lesões. O antibiótico eritromicina foi usado como marcador de resistência, permitindo o crescimento de *P. ananatis* e inibição das demais bactérias da folha. Três híbridos, HS200, DAS657, 2B710 foram utilizados, e a partir de 50 dias pós-semeadura (DAS), coletas semanais foram realizadas na safra verão 2008/2009 e quinzenais realizadas na safrinha/2009 até o surgimento das lesões. As folhas foram segmentadas (2,5g de massa fresca) e submetidas a dois processos: 1) Safra verão 2008/2009: agitação por duas horas a 60 RPM à 28°C em 100mL de tampão fosfato (pH 7,0) + 0,1(g/v) peptona bacteriológica; Safrinha/2009: agitação por duas horas a 140 RPM à 30°C em 100mL de tampão fosfato (pH 7,0) + 0,1(g/v) peptona bacteriológica e 2) maceração em 25mL de tampão fosfato (pH 7,0). Cerca de 0,1mL de cada tratamento foi plaqueado em meio TSA acrescido de eritromicina (1mg/mL) e em TSA sem antibiótico (controle). As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas até a avaliação das unidades formadoras de colônias. Os isolados utilizados na caracterização para nucleação de gelo foram cultivados em meio TSB por 24 horas, à 30°C e à 60RPM. 0,1mL da suspensão bacteriana foi acrescida à 1mL de água com temperatura externa abaixo de -1°C e observada a formação de gelo instantânea. Os isolados WT 2 e WT11 foram examinados em microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados permitiram observar uma grande variação no tamanho da população epifítica da bactéria durante o desenvolvimento da planta, indicando que *P. ananatis* possa ficar acumulada em diferentes regiões da planta, sem uma distribuição homogênea. A análise de similaridade revelou que os isolados se agruparam em apenas um grupo e através de testes bioquímicos revelou-se que os mesmos eram pertencentes à espécie *P. ananatis*. Não foram observadas diferenças entre os isolados de lesão e da superfície epifítica para a atividade de nucleação de gelo. Através de microscopia eletrônica de transmissão, demonstrou-se a presença de estruturas semelhantes à vesículas protéicas na membrana externa, sendo provavelmente as responsáveis pela liberação de núcleos de gelo. No teste de patogenicidade os isolados foram capazes de causar sintomas em casa de vegetação e em câmaras de microumidade.

Palavras-chave: Densidade populacional. Patogenicidade. Núcleos de gelo. "Ice nucleation"

SAUER, Aline Vanessa. **Monitoring and characterization of epiphytic population of *Pantoea ananatis*, causal agent of Maize White Spot.** 2010. 80 p. Dissertation (Master`s Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Pantoea ananatis, was recently described as the causative agent of Maize White Spot. The symptoms are characterized initially by initial chlorotic lesions aqueous, which become necrotic colored straw. This study aimed to monitor the population of epiphytic bacteria under natural conditions of infestation and characterize these bacteria by comparing them with those present in the lesions. The antibiotic erythromycin was used as a marker of resistance, allowing the growth of *P. ananatis* and inhibition of other bacteria of the leaf. Three hybrids, HS200, DAS657, 2B710 were used, and from 50 days after sowing (DAS), weekly collections were made in the 2008/2009 summer harvest and biweekly in little harvest/2009 until the appearance of lesions. The leaves were targeted (2.5 g fresh weight) and subjected to two processes: 1) Harvest summer 2008/2009: agitation for two hours at 60 RPM 28c in 100 mL of phosphate buffer (pH 7.0) + 0.1 (g/v) bacteriological peptone; little haverst/2009: agitation for two hours at 140 RPM at 30°C in 100 mL of phosphate buffer (pH 7.0) + 0.1 (g / v) bacteriological peptone and 2) in 25 mL of maceration phosphate buffer (pH 7.0). About 0.1 mL of each treatment was plated on TSA medium plus erythromycin (1mg/mL) and TSA without antibiotic (control). The plates were incubated at 30°C for 48 hours until the evaluation of colony forming units. The isolates used for the characterization of ice nucleation were grown in TSB medium for 24 hours, at 30°C and 60RPM. 0.1 mL of bacterial suspension was added to 1 mL of water with outside temperature below 1°C, and observed the formation of ice instantly. Isolates WT 2 and WT11 were examined in transmission electron microscopy. The results showed a wide variation in epiphytic size population of bacteria during plant development, indicating that *P. ananatis* can be accumulated in different parts of the plant, without a homogeneous distribution. The similarity analysis revealed that the isolates clustered in one group and by biochemical tests revealed that they belonged to the species *P. ananatis*. No differences were observed among isolates of injury and epiphytic surface for the activity of ice nucleation. Through transmission electron microscopy, showed the presence of structures similar to protein vesicles in the outer membrane, is probably responsible for the release of ice nuclei. In pathogenicity test, the isolates were able to cause symptoms in the greenhouse and chambers of microumidade.

Keywords: Population density. Pathogenicity. Ice nuclei. "Ice nucleation"

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Teste antibiograma. (A) comportamento do isolado 657/1 na presença de ácido nalidíxico (0,04 mg/mL). (B) comportamento do isolado F 102-4 na presença de eritromicina (0,4 mg/mL)43
- Figura 2** – Teste com o antibiótico eritromicina em diferentes concentrações em meio líquido TSB (Tryptic Soy Both). (A) (controle - TSB). (B) (TSB + isolado 1010/2 + eritromicina 0,4mg/mL). (C) (TSB + isolado 1010/2 + eritromicina 0,04mg/mL). (D) (TSB + isolado 1010/2 + eritromicina 0,004 mg/mL).....45
- Figura 3** – Desenvolvimento da população epifítica de *Pantoea ananatis* na cultura do milho através das médias das unidades formadoras de colônias sob dois diferentes processos de extração bacteriana na safra 2008/2009.....46
- Figura 4** – Desenvolvimento da população epifítica de *Pantoea ananatis* na cultura do milho através das médias das unidades formadoras de colônias sob dois diferentes processos de extração na safra 200947
- Figura 5** – Caracterização dos isolados de *P. ananatis* quanto a utilização de glicerol e sorbitol como fonte de carbono. Isolado obtido da lesão da Mancha Branca do Milho. (A) Controle - glicerol. (B) Isolado F 103-5 na presença de glicerol. (C) Controle - sorbitol. (D) Isolado F 103-5 na presença de sorbitol53
- Figura 6** – Caracterização dos isolados de *P. ananatis* quanto a utilização de glicerol e sorbitol como fonte de carbono. Isolado obtido da superfície epifítica de folhas da cultura do milho. (A) Controle - glicerol. (B) Isolado E3 L2 H-3 na presença de glicerol. (C) Controle - sorbitol. (D) Isolado E3 L2 H-3 na presença de sorbitol54

- Figura 7** – Dendograma mostrando a relação entre 15 isolados de *P. ananatis* oriundos da superfície foliar e aqueles obtidos diretamente das lesões da Mancha Branca do Milho, baseado na utilização diferencial das 95 fontes de carbono disponíveis nas Microplacas de Biolog GN. Isolados diretamente da lesão (■). Isolados epifíticos (□). Isolados INA+ (●). Isolados INA- (○). Isolados positivos para utilização de sorbitol e glicerol como fontes de carbono (▲). Isolados não testados para esta característica (■)54
- Figura 8** – Eletromicrografias de transmissão de células de *Pantoea ananatis*, isolada de lesões anasarcas da Mancha Branca do Milho, mostrando a presença de vesículas protéicas responsáveis pela liberação de núcleos de gelo (setas). **(A)** Isolado WT2 - cultivado em meio NB, mostrando a formação de uma única vesícula na região apical da célula. **(B)** e **(C)** Isolado WT2 - cultivado em meio NB+Glicerol, observar o aumento no número de vesículas (setas) em relação ao controle. **(D)** e **(E)** WT11 - controle com presença de apenas uma vesícula. **(F)** e **(G)** WT11 - em meio NB+Glicerol notar o aumento no número de vesículas (setas) quando comparado com o controle. As vesículas tanto em glicerol quanto o controle apresentam as mesmas características ultraestruturais. (A), (B), (C), (D) e (G) Aumento 97.000X e barra de 200nm. (E) e (F) aumento de 235.000X e barra de 100nm.....57
- Figura 9** – Inoculação artificial de *Pantoea ananatis* na cultura do milho em casa de vegetação. (A) Controle. (B) Isolado WT2. (C) e (D) Isolado WT7. (E) Isolado WT1161
- Figura 10** –Inoculação artificial de *Pantoea ananatis* em câmaras de microumidade em folhas de milho com 35 dias após a semeadura. (A) Controle. (B) Isolado WT2. (C) Isolado WT7. (D) e (E) Isolado WT1162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de <i>Pantoea ananatis</i> utilizados no desenvolvimento deste trabalho	32
Tabela 2 – Antibióticos utilizados no teste antibiograma e suas concentrações utilizadas (mg/mL de meio de cultura)	35
Tabela 3 – Antibióticos e suas concentrações utilizadas (mg/mL de meio de cultivo).....	36
Tabela 4 – Diâmetro dos halos (mm) observados quando isolados de <i>P. Ananatis</i> (Mancha Branca do Milho) foram submetidos aos testes de inibição em presença de diferentes antibióticos	42
Tabela 5 – Suscetibilidade de <i>Pantoea ananatis</i> aos antibióticos testados em suas diferentes concentrações.....	44
Tabela 6 – Teste de resistência de diferentes isolados de <i>Pantoea ananatis</i> ao antibiótico eritromicina em meio líquido TSB (Tryptic Soy Both) em três diferentes concentrações.....	45
Tabela 7 – Análise de variância e médias do tamanho da população epifítica de <i>Pantoea ananatis</i> através da contagem das unidades formadoras de colônias na Safra verão 2008/2009 em diferentes períodos de coleta de material para extração.....	49
Tabela 8 – Análise de variância e médias do tamanho da população epifítica de <i>Pantoea ananatis</i> através da contagem das unidades formadoras de colônias na Safrinha 2009 em diferentes períodos de coleta de material para extração.....	50
Tabela 9 – Identificação de <i>Pantoea ananatis</i> através de meio de cultura semi- seletivo a base de glicerol e sorbitol.....	52
Tabela 10 – Atividade de nucleação de gelo dos isolados de <i>Pantoea ananatis</i>	58
Tabela 11 – Análise de variância complementada pelo teste de Tukey através do número de lesões observados no teste de patogenicidade em casa de vegetação e em câmaras de microumidade. (Para as análises estatísticas dados foram transformados em raiz quadrada de $x+0,5$)	60

Tabela 12 – Dados meteorológicos do período correspondente às coletas das folhas dos três diferentes híbridos realizadas na safra verão 2008/2009 na Embrapa Soja- Londrina/Pr. ^a Primeira coleta. ^b Segunda coleta. ^c Terceira coleta. ^d Quarta coleta. ^e Quinta coleta79

Tabela 13 – Dados meteorológicos do período correspondente às coletas das folhas dos três diferentes híbridos realizadas na safrinha/2009 na Embrapa Soja- Londrina/Pr. ^a Primeira coleta. ^b Segunda coleta. ^c Terceira coleta. ^d Quarta coleta80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 CULTURA DO MILHO (<i>Zea mays</i>)	15
2.2 MANCHA BRANCA DO MILHO	16
2.2.1 Sintomatologia.....	16
2.2.2 Manejo da Doença	17
2.2.3 Etiologia.....	18
2.3 TAXONOMIA DE <i>Pantoea ananatis</i>	20
2.4 OCORRÊNCIA <i>Pantoea ananatis</i>	21
2.5 LOCALIZAÇÃO DA BACTÉRIA	23
2.6 "QUORUM-SENSING"	25
2.7 NUCLEAÇÃO DE GELO	26
3 ARTIGO – MONITORAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EPIFÍTICA DE <i>PANTOEA ANANATIS</i>, AGENTE CAUSAL DA MANCHA..	29
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	78
ANEXO A – Dados Meteorológicos.....	79

1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças que atingem a cultura do milho, a Mancha Branca do Milho apresenta destaque e importância. Instalou-se no Brasil na década de 80, e tem sido encontrada em praticamente todas as regiões produtoras de milho. A doença inicia-se pelo aparecimento de lesões foliares aquosas do tipo anasarca, de coloração verde-claro que posteriormente tornam-se necróticas de cor palha. Uma bactéria Gram-negativa, não esporulante, anaeróbia facultativa, formadora de colônias mucóides de coloração amarela brilhante, identificada como *Pantoea ananatis* foi recentemente descrita como sendo o agente causal da doença. A frequência de isolamento desta bactéria é maior nos estágios iniciais de desenvolvimento das lesões (em torno de 63%), diminuindo consideravelmente nos estágios posteriores. A forma de disseminação desta bactéria no ambiente e na planta ainda não estão totalmente esclarecidas, bem como os fatores envolvidos na sua patogenicidade. *P. ananatis* é um microrganismo que reside epifiticamente nas folhas de milho e que, por diversos fatores ainda desconhecidos, pode eventualmente desencadear doença em seu hospedeiro. A baixa população epifítica de *P. ananatis* sobre folhas de milho resulta em baixa incidência da doença no campo, sendo que um expressivo aumento da população bacteriana sobre as folhas resulta no aparecimento dos sintomas. Muitas espécies de bactérias, incluindo as do gênero *Pantoea*, apresentam mecanismos químicos de comunicação intercelular que permitem a percepção da densidade populacional entre as bactérias. A sinalização ocorre por alterações ambientais, tais como diferenças de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, o que auxilia o desenvolvimento de sistemas que permitem uma adaptação das bactérias ao meio ambiente. Para várias espécies bacterianas esse fenômeno tem importância não só na sobrevivência como também na patogenicidade. Nada é conhecido sobre o papel que as substâncias sinalizadoras produzidas por *P. ananatis* ocupam durante a transição do estágio epifítico para o estágio patogênico na doença Mancha Branca do milho.

Muitas plantas são incapazes de suportar a formação de cristais de gelo nos espaços intercelulares de seus tecidos, e quando tal fato ocorre, o sistema de membranas da célula vegetal entra em colapso e ocorre a mancha encharcada ou anasarca, seguida da morte dos tecidos por congelamento. Algumas bactérias

associadas a plantas possuem a capacidade de congelar água em temperaturas onde normalmente este fenômeno não ocorreria. Várias espécies de bactérias possuem a capacidade de catalisar a formação do gelo em temperaturas relativamente altas, fenômeno conhecido como "*Ice Nucleation*" e as bactérias que apresentam esta característica são fenotipicamente conhecidas como INA+. Diversas cepas de *P. ananatis* isoladas de lesões da Mancha Branca do milho apresentaram essa capacidade de nucleação de gelo quando expostas a temperaturas baixas.

O objetivo desta proposta foi de avaliar o tamanho da população epifítica de *P. ananatis* sobre as folhas de milho necessária para a promoção dos sintomas da doença e caracterizar esses isolados epifíticos de *P. ananatis* comparando-os com isolados obtidos da Mancha Branca do Milho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO MILHO (*Zea mays*)

Dentre os principais cereais produzidos mundialmente, o milho se destaca por sua importância econômica e social, caracterizando-se pela ampla diversidade de utilização. Em muitas regiões do mundo, o milho e seus derivados, se constituem em uma importante base alimentícia entre a população de baixa renda e sua versatilidade permite seu uso se estender à indústria de alta tecnologia (DUARTE, 2000).

O Brasil é considerado o terceiro maior produtor mundial de milho (CENTRO DE INTELIGÊNCIA DE MILHO, 2009) se posicionando atrás dos EUA e China. No mercado internacional, o Brasil representa umas das menores produtividades entre os exportadores (SOLOGUREN, 2009). Na China, a qualidade das sementes é ruim, e os produtores semeiam mais que o dobro de sementes por metro, e mesmo assim sua produtividade é considerada maior que a produtividade brasileira (GLAT, 2009). As exportações brasileiras da safra 2009 representam 36% acima do volume em relação ao primeiro quadrimestre da safra de 2008 (MIKLASEVICIUS; FREITAS JR, 2009).

De acordo com a estimativa para a safra 2008/2009 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2009) a produção de grãos no Brasil sofreu uma redução de 6,9% com relação à safra de 2007/2008, tendo como colaborador para este fato a estiagem ocorrida nos meses de abril e maio nos principais estados brasileiros produtores de milho e soja. Estima-se uma redução de 15% no cenário da produção nacional para a atual safra do cereal devido às condições climáticas. Embora as estimativas atuais apontem essa quebra na produção de milho, as projeções futuras indicam que a área de cultivo deverá permanecer inalterada na safra 2009/2010 em comparação com a safra dos anos 2007/2008. Na safra de 2007, o milho foi considerado o destaque na produção de grãos nacional com crescimento de 21,5% em comparação à safra do ano de 2006, devido ao maior produtor e exportador mundial (EUA) destinar grande parte da sua produção à confecção de etanol (IBGE, 2008).

2.2 MANCHA BRANCA DO MILHO

2.2.1 Sintomatologia

A mancha branca foi inicialmente considerada de importância secundária, em consequência da alta incidência e prejuízos causados à produção e atualmente se distingue como uma das principais doenças da cultura (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000).

A doença inicia-se pelo aparecimento de lesões foliares aquosas do tipo anasarca, de coloração verde-claro que posteriormente tornam-se necróticas de cor palha. As lesões possuem formato elíptico a circular, de número variável sobre as folhas e podendo seu diâmetro variar entre 0,3 e 1 cm (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000) de acordo com o nível de resistência do material cultivado (PACCOLA-MEIRELLES *et al.*, 2002), sendo que as lesões podem coalescer mediante ataques severos (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006) e serem classificadas de acordo com sua morfologia e seu estágio, onde manchas anasarcas referem-se ao estágio 1, manchas acinzentadas correspondem ao estágio 2, lesões necrosadas sem estruturas fúngicas visíveis ao estágio 3 e lesões necrosadas com estruturas reprodutivas fúngicas visíveis ao estágio 4 (PACCOLA-MEIRELLES *et al.*, 2001). Geralmente os primeiros sintomas surgem nas folhas inferiores, progredindo rapidamente para o ápice da planta, sendo sua severidade maior após o pendoamento (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000).

A Mancha Branca do Milho é favorecida pela elevada umidade relativa do ar em conjunto com freqüentes períodos de chuva (SAWAZAKI *et al.*, 1997), podendo ocasionar seca prematura de folhas e redução do tamanho e peso dos grãos, bem como reduzir o ciclo da cultura. Semeaduras realizadas tardiamente condicionam o desenvolvimento sob períodos de altas precipitações pluviométricas, contribuindo para o seu desenvolvimento (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000). A severidade da doença em altos níveis foi observada quando a temperatura mínima do ar e a média da umidade relativa foram iguais ou superiores a 14°C e 60%, respectivamente, ou em condições de temperatura mínima inferiores a 14°C mas com umidade relativa igual ou superior a 65%. Não houve incidência da doença

quando a temperatura mínima foi superior a 14°C e a umidade relativa inferior a 60% (FERNANDES *et al.*, 1995).

De acordo com Godoy, Amorim e Bergamin Filho (2001), o efeito do patógeno na taxa fotossintética do hospedeiro não é fornecido através de uma simples quantificação visual da severidade da doença no milho, havendo redução da taxa fotossintética não apenas no tecido lesionado, mas também em partes de tecidos verdes remanescentes de folhas infectadas. Folhas inseridas no intervalo de 10 a 20% de severidade de doença expressaram redução de 40% na taxa fotossintética líquida. A taxa de transpiração exibiu correlação negativa significativa proporcional à severidade da doença, explicando a redução do tecido sadio.

2.2.2 Manejo da Doença

Pouco se sabe sobre a disseminação e sobrevivência de *P. ananatis* na cultura do milho, podendo o inóculo primário ter origem nos restos culturais (PEREIRA; CARVALHO; CAMARGO, 2005; FERNANDES; OLIVEIRA, 2000). Deste modo, a prática de semeadura direta, pode elevar o potencial de inóculo com o decorrer do tempo, sujeitando as lavouras de milho nesse sistema de cultivo, à ocorrência da doença em alta severidade. A incorporação dos restos culturais ao solo é recomendada para acelerar o processo de decomposição antes da próxima semeadura (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000).

A doença possui infestações mais severas quando a semeadura é realizada entre a segunda quinzena de novembro a março (PEREIRA; CARVALHO; CAMARGO, 2005), portanto, recomenda-se a realização de plantios mais cedo, nos meses de setembro e outubro, com a finalidade de evitar que a doença incida com maior severidade sobre a cultura (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000).

O método de controle mais eficiente e o mais utilizado no Brasil se constitui no uso de cultivares de resistentes, especialmente nas regiões onde o patógeno encontra condições ótimas de desenvolvimento (PEREIRA; CARVALHO; CAMARGO, 2005).

2.2.3 Etiologia

Desde a sua instalação no Brasil na década de 80, existem controvérsias com relação ao agente causal da doença. Fantin (1994), identificou a doença como sendo a mancha foliar de "Phaeosphaeria", descrita por Rane, Payak e Renfro (1966), e causada pelo fungo ascomiceto *Phaeosphaeria maydis* (P.Henn) Rane, Payak e Renfro (sin. *Sphaerulina maydis* P. Hennings = *Leptosphaeria zae maydis* Sacc) (f. imperfeita *Phyllosticta* sp.). Essa doença encontra-se distribuída amplamente no mundo, nas principais regiões produtoras de milho, dentre elas Ásia, África, América do Sul, Central e do Norte (CARSON, 1999). A doença descrita por Rane, Paiak e Renfro (1966) caracteriza-se pela presença de lesões foliares esbranquiçadas contendo no seu interior as estruturas fúngicas do patógeno. Fernandes (1985) descreveu esta doença como sendo semelhante a doença "Holcus spot" causada por uma bactéria, a *Pseudomonas syringae* (sin. *Xantomonas holcicola*). No entanto Fantin (1994) a descreve como sendo a mesma doença descrita por Rane, Payak e Renfro (1966) e causada pelo fungo *P. maydis*.

Muitos autores relatam a dificuldade no isolamento do fungo a partir das lesões e a dificuldade também na reprodução dos sintomas (SAWAZAKI *et al.*, 1997; PACCOLA-MEIRELLES *et al.*, 2001; AMARAL *et al.*, 2005; CERVELATTI *et al.*, 2002; BOMFETI *et al.*, 2008). Desta forma surgiram dúvidas sobre a real identidade do agente causal da doença.

Paccola-Meirelles *et al.* (2001) isolaram uma bactéria formadora de colônias mucóides de coloração amarela brilhante a partir de lesões no estágio inicial da doença, as lesões anasarcas. Esta bactéria identificada como pertencente à espécie *Erwinia ananas*, reproduziu sintomas semelhantes àqueles da doença quando inoculada em plantas de milho sob condições controladas. Segundo Paccola-Meirelles *et al.* (2001) a frequência de isolamento desta bactéria foi maior nos estágios iniciais de desenvolvimento das lesões (em torno de 63%), diminuindo consideravelmente nos estágios posteriores. Esta espécie é uma bactéria Gram-negativa, não esporulante, aeróbia facultativa. Esses autores sugeriram a denominação de Mancha Branca do Milho à doença em substituição ao nome Mancha foliar de *Phaeosphaeria*.

Cervelatti *et al.* (2002) usando técnicas bioquímicas e moleculares, compararam isolados fúngicos advindos de picnídios e pseudotécios encontrados em lesões foliares. Os perfis eletroforéticos de a e (3 esterase, indicaram que as formas anamórficas e teleomórficas anteriormente descritas como sendo da mesma espécie, pertenciam à espécies distintas. Picnídios observados nos centros das lesões, não pertenciam ao fungo *Phyllosticta* sp., mas eram pertencentes à *Phoma tropica*, espécie fúngica de natureza saprófita e colonizadora de lesões pré-estabelecidas. Assim esse fungo foi considerado como um oportunista que colonizaria lesões já pre-estabelecidas pela bactéria.

Amaral *et al.* (2004, 2005), apresentaram uma outra hipótese a de que a doença seria causada por diferentes agentes (*Phoma* sp., *Phyllosticta* sp., *sporormiella* sp.) causando sintomas semelhantes no mesmo hospedeiro.

O fungo *sclerophthora*, classe Oomicetes, também foi descrito erroneamente como provável agente causal da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2004). No entanto, com o intuito de esclarecer e evitar confusões na comunidade científica, essas informações foram criticadas por Casela e Ferreira (2006) devido a evidentes contradições encontradas neste trabalho. As estruturas fúngicas apresentadas por Oliveira *et al.* (2004), não condizem com estruturas de organismos pertencentes ao gênero *sclerophthora*; além do que as informações apresentadas pelos autores não comprovam a patogenicidade do suposto agente causal, sendo classificada por Casela e Ferreira (2006) como carentes de base científica.

As evidências do envolvimento da bactéria como agente iniciador da doença foram reforçadas por Paccola-Meirelles *et al.* (2002) ao inocular o patógeno em plantas milho de híbridos suscetíveis e resistentes em casa de vegetação, obtendo sintomas similares aos encontrados à campo.

Bomfeti *et al.* (2008) por meio de Microscopia eletrônica confirmaram a presença da bactéria em lesões oriundas de tecidos foliares naturalmente infectados e lesões obtidas de folhas inoculadas artificialmente. Um grande número de células bacterianas foi visualizado nos espaços intercelulares nessas lesões. Estruturas fúngicas não foram visualizadas em lesões jovens. Neste mesmo trabalho os autores, utilizando técnicas moleculares, isolaram o DNA de lesões anasarcas e de lesões necrosadas e o amplificaram com oligonucleotídeos específicos para bactérias (genes 16S rRNA e *rpoB*), e oligonucleotídeo universal para fungo (ITS 1 e 4). Amplificação foi positiva somente com primers bacterianos. Nenhuma

amplificação foi observada em lesões jovens quando o primer ITS4 foi usado. No entanto a amplificação com esse primer foi bem sucedida em lesões necrosadas, o que levou os autores a concluir que espécies fúngicas podem colonizar as lesões pré-estabelecidas pela bactéria. Ainda, o teste de Elisa indireto utilizando antissoro policlonal produzido em coelho contra células da bactéria isolada de lesões anasarcas, também confirmou a presença da bactéria nestas lesões (PACCOLA-MEIRELLES, 2008).

Para Paccola-Meirelles (2008), os resultados obtidos em sua linha de pesquisa comprovam ser uma bactéria o agente causal da Mancha Branca do Milho, e não um fungo como descrito por outros autores. A bactéria iniciaria o processo de colonização dos tecidos foliares de plantas de milho e os fungos instalar-se-iam nas lesões pré-estabelecidas pela bactéria. Recentemente autores como Lanza (2009), Silva *et al.* (2007) e Marriel *et al.* (2004), após isolamento da bactéria a partir de diferentes regiões produtoras de milho tiveram êxito na reprodução dos sintomas sob condições controladas, reforçando ser a bactéria o agente causal da doença e não um fungo como descrito inicialmente.

2.3 TAXONOMIA DE *Pantoea ananatis*.

Inicialmente a bactéria descrita por Paccola-Meirelles *et al.*, (2001) como sendo o agente causal da mancha branca do milho foi identificada como *Erwinia ananas* pertencente á família das *Enterobacteriaceae*. É uma bactéria Gram-negativa formadora de colônias mucóides de coloração amarelo brilhante. A espécie foi transferida para o gênero *Pantoea* por Mergaert, Verdonck e Kersters (1993) que a denominaram de *Pantoea ananas* (SERRANO, 1928). Em 1997 Trüper e De' Clari a renomearam para *Pantoea ananatis*.

2.4 OCORRÊNCIA DE *Pantoea ananatis*

Esta espécie tem sido observada como patógeno em várias culturas. Watanabe, Kawakita e Sato (1996) isolaram e caracterizaram uma linhagem de *E. ananas* (syn. *Pantoea ananas*) capaz de infectar arroz e descreveram o envolvimento desta bactéria no desenvolvimento da doença conhecida como "hopperburns".

Azad, Holmes e Cooksey (2000) descreveram *P. ananatis* na Califórnia (EUA) como sendo causadora de uma nova doença em capim-sudão (*sorghum sudanense*). Os sintomas se caracterizam por grandes manchas brancas associadas freqüentemente com margens marrons escuras, de onde *P. ananatis* foi consistentemente isolada. A identidade do patógeno foi confirmada através de testes bioquímicos, morfológicos e cumprimento dos postulados de Koch. Em adição isolados de *P. ananatis* obtidos do capim-sudão foram eficientes em reproduzir sintomas semelhantes em milho e aveia.

P. ananatis foi descrita por Goszczyńska *et al.* (2007) causando doença em milho na África do Sul, ocasionando fendas verticais no colmo, podendo romper os internódios, apresentando coloração marrom-escura, sendo esta determinada como podridão marrom do colmo. No teste de patogenicidade, observou-se a indução por um dos isolados, à promoção dos sintomas foliares. Os autores citam a possibilidade da bactéria ser transmitida por um vetor desconhecido, porém nenhum relato adicional comprovou esta suposição. Recentemente Pérez-y-Terrón *et al.* (2009) isolaram e detectaram a bactéria *P. ananatis* no México, causando lesões foliares em milho.

Em cebola (*Allium cepa* L.), a bactéria é encontrada causando podridão central. A bactéria é transmitida por Trips e habita a flora intestinal deste vetor (GITAITIS *et al.*, 2003), além de infectar naturalmente as sementes de cebola (WALCOTT *et al.*, 2002).

Gitaitis *et al.* (2002) verificaram que *P. ananatis* pode sobreviver e colonizar a superfície epifítica de plantas invasoras em campos de produção de cebola e em espécies cultiváveis utilizadas em rotação de culturas, inclusive com a cultura de milho. A identificação da bactéria pelos autores se deu através do

desenvolvimento de um par de primers específico para o patógeno e por meio de testes bioquímicos.

No Japão, a bactéria foi encontrada em melão ocasionando podridão interna caracterizada por odor fétido e coloração marrom em torno da placenta dos frutos cultivados em estufas comerciais. Cepas de *P. ananatis* isoladas do arroz não se mostraram patogênicas quando inoculadas em frutos de melão, indicando que nem todas as cepas bacterianas são patogênicas à todas as plantas hospedeiras conhecidas (KIDO *et al.*, 2008).

Outras espécies do gênero *Pantoea* já foram identificadas como causadoras de doenças em espécies cultivadas e na cultura do milho. *P. stewartii* é citada como um importante agente da doença. Segundo Block, Hill e Mcgee (1998) os riscos de transmissão do patógeno através de sementes de boa qualidade são mínimos e que insetos vetores poderiam contribuir significativamente para a disseminação da bactéria nos campos de produção. Estudos diversos objetivando esclarecimentos sobre a transmissão através de insetos vetores para esta doença tem sido realizados (ESKER; NUTTER JR., 2003; MENELAS *et al.*, 2006).

Pesquisas dessa natureza com *P. ananatis* na cultura do milho são praticamente inexistentes.

Na cultura do abacaxi, *Pantoea citrea* foi identificada como agente da doença rosa do abacaxi, induzindo a formação de compostos que tornam a coloração da polpa, suco e frutos, rosa a marron-avermelhada (CHA *et al.* 1997) devido à oxidação de glicose para glucanato através do acúmulo de 2,5 diketoglucanato (2,5 DKG), um composto altamente cromogênico responsável pela coloração escura (PUJOL; KADO, 2000). Outra espécie do gênero *Pantoea* que também infecta outras culturas em diversos locais no mundo, dentre elas o milho é *P. agglomerans* que no México, por exemplo, é citada como causadora de murchas vasculares e crestamento foliar no milho e sorgo (MORALES-VALENZUELA *et al.*, 2007). Nos EUA, esta bactéria também foi encontrada causando crestamento foliar e podridão de bulbos (EDENS *et al.*, 2006).

2.5 LOCALIZAÇÃO DA BACTÉRIA

P. ananatis é uma espécie encontrada epifiticamente em folhas de milho. Populações de bactérias fitopatogênicas que residem epifiticamente sobre plantas podem progredir em seu tamanho mesmo na ausência da manifestação da doença sobre as folhas. O desenvolvimento da doença é favorecido por condições ambientais e dependente das vias de entrada no hospedeiro (BEATTIE; LINDOW, 1995). O tamanho destas populações também pode variar em função da linhagem bacteriana e suscetibilidade da espécie hospedeira (O'BRIEN; LINDOW, 1989). O teor de água, o local e nutrientes do solo, além de fatores como deposição exógena de nutrientes, contribuem para definir o tamanho das populações epifíticas bacterianas (KINKEL; WILSON; LINDOW, 2000).

Outra limitação importante para o tamanho da população epifítica, constitui-se em fontes de carbono disponíveis na superfície foliar (MERCIER; LINDOW, 2000). A idade da planta e sua estrutura contribuem significativamente para o aumento do tamanho da população bacteriana epifítica, refletindo em diferenças fisiológicas entre folhas (JACQUES; KINKEL; MORRIS, 1995; KINKEL WILSON; LINDOW, 2000). Elementos como pilosidade, comprimentos dos pêlos, densidade estomática e taxa de transpiração, são características anatômicas e fisiológicas que podem apresentar correlação positiva com populações microbianas foliares, podendo fornecer microclima favorável ao crescimento microbiano epifítico na filosfera (DE COSTA *et al.*, 2006).

Segundo Lindemann, Arny e Upper (1984) a ocorrência de uma doença está relacionada com um pronunciado aumento da população epifítica, que por sua vez pode estar associada à intensidade e freqüência de cultivo da espécie hospedeira. A patogenicidade de uma fitobactéria pode estar relacionada com sua habilidade em sobreviver e multiplicar sobre as folhas mesmo em condições ambientais de estresse (WILSON; HIRANO; LINDOW, 1999). Jacques, Kinkel e Morris (1995) enfatizam a importância da folha e idade da planta na dinâmica das populações bacterianas e como a idade da planta pode interagir na imigração e no crescimento bacteriano.

Estudos do tamanho da população epifítica de *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* causando doença em plântulas de trigo revelaram que o

tamanho da população associada às folhas e a severidade dos sintomas aumentaram conforme o aumento da concentração de inóculo em inoculações artificiais. Em função da densidade populacional, o potencial de *X. translucens* pv. *translucens* em causar doença pode variar, bem como pode variar também o tempo para aparecimento de sintomas conforme a concentração do inóculo e condições ambientais encontradas a campo (STROMBERG; KINKEL; LEONARD, 1999).

Os gêneros mais comuns de bactérias epifíticas são as Gram-negativas, dentre elas: *Pantoea*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (BLAKEMAN, 1993). *P. ananatis* é um microrganismo que reside epifiticamente nas folhas de milho e que, por diversos fatores ainda desconhecidos, pode eventualmente desencadear doença em seu hospedeiro (ESCANFERLA *et al.*, 2006). WYSMIERSKI; REAL; PACCOLA-MEIRELES, 2006 observaram que a baixa população epifítica de *P. ananatis* sobre folhas de milho se reflete na baixa incidência da doença no campo e que a doença surge somente após um pronunciado aumento da população da bactéria *P. ananatis* sobre as folhas.

A dificuldade em identificar os precursores da doença no processo infeccioso pode estar relacionada com seu mecanismo prolongado e assíncrono (MONIER; LINDOW, 2004) e imprevisibilidade das condições ambientais, além da susceptibilidade do hospedeiro (BLAKEMAN, 1993). Métodos para estimar e estudar o tamanho de populações sobre a superfície foliar têm sido desenvolvidos. Morris, Monier e Jacques (1998) desenvolveram uma técnica para estimar a proporção da população epifítica total em superfícies foliares agregadas em biofilme através de lavagem das folhas, filtragem e ultra-som, além de permitir a realização de comparações entre a composição taxonômica e genética e de perfis fisiológicos de biofilmes e unidades bacterianas encontrados na filosfera. Wang *et al.* (2007) consideram que sua metodologia de detecção de bactérias sobre as folhas através de um marcador constituído de uma proteína verde fluorescente (GFP), em breve tornar-se-á uma ferramenta popular neste tipo de pesquisa, sendo possível monitorar em tempo real o desenvolvimento da doença bacteriana em toda a extensão da planta através de ultra-violeta, bem como acompanhar a infecção, localização, atividade e movimento a nível celular sob microscopia eletrônica.

2.6 "QUORUM-SENSING"

Muitas espécies de bactérias, incluindo as do gênero *Pantoea*, apresentam mecanismos químicos de comunicação intercelular conhecidos como "quorum-sensing", que permitem a percepção da densidade populacional entre as bactérias. Esta comunicação é resultante da secreção de sinais moleculares de baixo peso molecular, sintetizados por células individuais (RUMJANEK; FONSECA; XAVIER, 2004), cuja concentração extracelular está relacionada com a densidade populacional de bactérias (OLIVEIRA, 2005). A sinalização ocorre por alterações ambientais, tais como diferenças de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, o que auxilia o desenvolvimento de sistemas que permitem às bactérias se adaptarem ao meio ambiente. Para várias espécies bacterianas esse fenômeno tem importância não só na sobrevivência como também na patogenicidade, uma vez que a expressão da virulência pode estar sob controle do sistema de "quorum sensing" (PEARSON *et al.*, 1994). Assim, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizam o circuito de comunicação "quorum sensing" para regular diversas atividades, incluindo simbiose, virulência, competência, conjugação, produção de antibióticos, mobilidade, esporulação e formação de biofilmes (MILLER; BASSLER, 2001). Uma vez secretadas as moléculas de sinalização, as mesmas são detectadas por receptores membranares específicos permitindo que as células reconheçam o tamanho da população por meio da concentração dos sinais e, quando o nível crítico é atingido, elas passam a agir em grupo como um único indivíduo. As substâncias sinalizantes em bactérias Gram-negativas são as acyl-homoserinas lactonas (AHL) (WHITEHEAD *et al.*, 2001) e sua produção por *P. ananatis* já foi reportada em isolados de abacaxi (POMINI; ARAUJO; MARSAIOLI, 2006a) e em *Pantoea* isolada de lesões da Mancha Branca do Milho (POMINI; PACCOLA-MEIRELLES, MARSAIOLI, 2006b; POMINI; PACCOLA-MEIRELLES, MARSAIOLI, 2007). Um exemplo da importância do "quorum sensing" em bactérias fitopatogênicas foi dado por Bodman e Farrand (1995) em uma bactéria patogênica do milho, *P. stewartii*. Esta bactéria produz uma substância sinalizadora que controla a expressão de fatores relacionados à virulência e à invasão ao hospedeiro, além de produzir um exopolissacarídeo que protege as células bacterianas contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Morohoshi *et al.* (2007) demonstraram que esta bactéria

possui sistema de "quorum sensing" muito semelhante ao de *P. ananatis* e que sua patogenicidade pode ser regulada por AHL e mediadas pelo sistema de "quorum sensing".

Nada é foi descrito ainda sobre o papel que as substâncias sinalizadoras produzidas pela *P. ananatis* ocupam durante a transição do estágio epifítico para o estágio patogênico na doença Mancha Branca do Milho.

2.7 NUCLEAÇÃO DE GELO

Muitas plantas, especialmente as originadas de regiões tropicais ou subtropicais, são incapazes de suportar a formação de gelo nos espaços intercelulares de seus tecidos, e quando tal fato ocorre, o sistema de membranas da célula vegetal entra em colapso e ocorre a mancha encharcada ou 'anasarca', sucedida pela morte dos tecidos por congelamento. Este fenômeno é conhecido por nucleação de gelo e se destaca biologicamente quando relacionado em plantas de interesse económico (ROMEIRO, 2001).

Na década de 70, Lindow, Arny e Upper (1978) relataram a capacidade de algumas bactérias comumente associadas a plantas de atuar como nucleantes de gelo, sob temperaturas um pouco abaixo de 0°C, causando sérios danos à planta devido a um supercongelamento em temperaturas onde normalmente este fenômeno não ocorreria. Na literatura várias espécies de bactérias foram descritas como portadoras da capacidade de catalisar a formação do gelo em temperaturas relativamente altas (MAKI, *et al.*, 1974; MASON; HALLETT, 1957), fenômeno conhecido como "*Ice Nucleation*" e as bactérias que apresentam esta característica são fenotipicamente conhecidas como INA+. Várias espécies de bactérias são ativas na nucleação do gelo (INA⁺). Espécies como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia ananas*, *E. herbicola* e *Xanthomonas campestris* têm sido descritas como causadoras de enormes injúrias pelo frio, atuando como nucleantes de gelo em gotas de orvalho, onde os cristais de gelo formados crescem e propagam-se no tecido da planta enquanto danificam as células (LINDOW, 1983; ARAI; WATANABE, 1986; OKADA *et al.*, 1990). Diversas cepas de *P. ananatis* isoladas de lesões da Mancha Branca do Milho apresentaram essa

capacidade de nucleação de gelo quando expostas a temperaturas baixas (ESCANFERLA, 2005, ESCANFERLA *et al.*, 2006; WYSMIERSKI; ESCANFERLA; PACCOLA-MEIRELES, 2005; WYSMIERSKI; REAL; PACCOLA-MEIRELES, 2006).

A grande maioria dos nucleantes de gelo de origem biológica possuem um domínio proteico característico, que consiste de seqüências repetidas de aminoácidos, essencial para esta atividade. Nesse sentido, várias evidências indicam que existem substâncias nucleantes de gelo na membrana externa das bactérias, não sendo componentes solúveis na célula, podendo ainda estar relacionados a fosfolípidios e a outros fatores ligados a proteínas.

Kawahara (2002) relata em seu trabalho sobre o conhecimento e a função de três tipos de proteínas capazes de regular a atividade nucleante de gelo em bactérias. A proteína "ice nucleation" (INP) atua como um iniciador para a formação do gelo; a proteína anti-nucleante (PNA) como inibidora da formação destes nucleantes de gelo e a proteína anti-congelamento (AFP) que diminui a temperatura de congelamento, modificando ou suprimindo o crescimento de cristais de gelo, inibindo a recristalização e protegendo a membrana celular dos danos induzidos pelo frio.

Estas proteínas estão localizadas na superfície da membrana celular, podendo causar danos às plantas (LINDOW, 1983). Segundo Lindow (1983) os genes para nucleação de gelo (genes *Ina*) não estão dispersos no cromossomo da bactéria, e provavelmente foram adquiridos via transferência lateral, por meio de conjugação entre membros da 'comunidade epifítica'. O fenótipo de nucleação de gelo é controlado pelo gene INA que possui um papel importante na virulência de fitobactérias. Nem todos isolados bacterianos portadores desse gene obrigatoriamente expressam o fenótipo para nucleação de gelo. Esta distribuição variada deste fenótipo, propõe que o gene INA tenha seguido um caminho evolutivo incomum na evolução destas bactérias, como a transferência horizontal deste gene (EDWARDS *et al.*, 1994).

Em *E. herbicola*, Phelps *et al.* (1986) descreveram a liberação de nucleantes de gelo no meio de cultura através de vesículas limitadas por membranas, quando a bactéria foi cultivada a 15°C. Ramstedt, Astrom e Von Fircks (1994) demonstraram que a bactéria INA+, *P. syringae*, causou uma infecção necrótica quando a temperatura flutuou ao redor de 0°C. Watanabe e Arai (1987) descreveram a cepa IN-10 de *E. ananas* como tendo a capacidade de congelar a

água mais eficientemente que as demais cepas analisadas dentro da espécie. Assim, podem ocorrer variações quanto a capacidade de nucleação do gelo dentro de uma mesma espécie, e até mesmo dentro de uma mesma população.

Apesar de vários mecanismos terem sido propostos demonstrando as vantagens seletivas das bactérias que causam injúrias por congelamento, nenhum foi demonstrado experimentalmente, mas está claro que a presença destas bactérias na superfície de folhas pode alterar e destruir micro-habitats nas folhas em temperaturas baixas. Hirano e Upper (2000) propuseram um modelo no qual as formações de lesões resultam de super populações bacterianas INA+, aliadas a condições favoráveis resultantes de diferenças de temperaturas.

Em 1989, Abe e colaboradores sequenciaram o gene *inaA* da cepa IN-10 de *E. ananas* e compararam a seqüência completa de nucleotídeos com os genes *inaW* e *inaZ*, que são responsáveis pelo fenótipo da nucleação de gelo em *P. syringae* e *P. fluorescence*, respectivamente, e verificaram a existência de regiões altamente conservadas entre os domínios dos genes, com pouca variabilidade na seqüência de aminoácidos. Segundo os autores, o gene *Ina A* de *E. ananas* possuem 1322 aminoácidos, com várias seqüências repetidas ao longo do gene, denominadas 'domínio R', além dos 'domínios N e C', com seqüências para resíduos N e C terminais, respectivamente. Turner, Arellano e Kosloff (1991) identificaram em isolados de *P. syringae* componentes de natureza não proteica associados ao produto da proteína conhecida *Ina Z* e sugerem em seus resultados que este mecanismo é necessário para a eficácia da nucleação de gelo, sendo estes componentes não protéicos fundamentais na obtenção de uma estrutura eficiente de nucleação de gelo da proteína externamente fixada na célula eucariótica.

A atividade de nucleação de gelo tem sido explorada como opção na indústria alimentícia no congelamento de diversos tipos de alimento, especialmente nos que se constituem em fontes proteicas (ARAI; WATANABE, 1986; ZASYPKIN; LEE, 1999).

3 ARTIGO :

MONITORAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EPIFÍTICA DE *Pantoea ananatis*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA BRANCA DO MILHO.

Aline Vanessa Sauer

Resumo: A Mancha Branca do milho apresenta destaque e importância, se qualificando como uma das principais doenças que atingem a cultura causando apreciáveis danos. A doença é causada pela bactéria *Pantoea ananatis* e seus sintomas se iniciam como manchas cloróticas anasarcas que posteriormente evoluem para lesões necróticas. Este trabalho teve por objetivo monitorar o tamanho da população epifítica de *P. ananatis* e caracterizar isolados obtidos da superfície epifítica comparando-os com os isolados diretamente de lesões foliares. Foi utilizado o antibiótico eritromicina (0,04mg/mL) como marcador para selecionar a bactéria *P. ananatis* separando-as das demais espécies epifíticas. Foram utilizados os híbridos de milho 2B710, DAS 657 e HS 200. Na safra verão 2008/2009 as coletas do material foram realizadas semanalmente e na safrinha 2009 foram realizadas coletas quinzenais até a manifestação natural dos sintomas à campo. As folhas foram segmentadas até completar 2,5g de massa fresca e separadas em dois processos de extração bacteriana: 1) por agitação e 2) por maceração dos segmentos foliares em tampão fosfato (pH 7,0). Quantificou-se as UFCs em cada coleta e alguns dos isolados foram selecionados e para a caracterização foram empregadas técnicas bioquímicas. Os sintomas foram observados aos 84 e 98 dias após a semeadura nas safras verão 2008/2009 e safrinha/2009 respectivamente. Dos 51 isolados testados, 35 foram caracterizados como positivos para atividade de nucleação de gelo. Os isolados WT2 e WT11 classificados como INA+ quando analisados na Microscopia Eletrônica de Transmissão apresentaram sobre a parede celular, vesículas pela liberação de núcleos de gelo. A formação dessas vesículas aumentou quando os isolados foram cultivados em presença de glicerol. No teste de patogenicidade, os isolados utilizados demonstraram-se capazes de promover os sintomas sob condições controladas tanto em casa de vegetação como em folhas destacadas em câmaras de microumidade.

Palavras-chave: Densidade populacional. Patogenicidade. Núcleos de gelo. "Ice nucleation"

Abstract: The White Spot Maize has the highlighted and importance, qualifying as one of the major diseases affecting the crop causing considerable damage. The disease is caused by the bacterium *Pantoea ananatis* and their symptoms begin as anasarca chlorotic spots that later develop into necrotic lesions. This study aimed to monitor the population size of epiphytic *P. ananatis* and characterize isolates of epiphytic surface comparing them with the isolated directly from leaf lesions. We used the antibiotic Erythromycin (0.04 mg/mL) as a marker to select the bacteria *P.*

ananatis separating them from other epiphytic species. We used the hybrid 2B710, DAS 657 and HS 200. In the summer harvest 2008/2009 collections of material were made out weekly and little harvest 2009 were collected every two weeks until the natural manifestation of symptoms in the field. The leaves were targeted to complete 2.5 g fresh weight and separated in two process of bacterial extraction: 1) by shaking and 2) by maceration the leaf segments in phosphate buffer (pH 7.0). Was quantified CFUs in each collection and some of the isolates were selected and were used to characterize biochemical techniques. Symptoms were observed at 84 and 98 DAS in summer harvest 2008/2009 and little harvest/2009 respectively. Of the 51 isolates tested, 35 were characterized as positive for activity of ice nucleation. Isolates WT2 and WT11 classified as INA + when analyzed in Transmission Electron Microscopy presented on the cell wall, vesicles release the ice nuclei. The formation of these vesicles increased when the isolates were grown in the presence of glycerol. In the pathogenicity test, the isolates used have shown themselves capable of promoting the symptoms under controlled conditions both in greenhouse and in detached leaves in chambers microumidade.

Keywords: Population density. Pathogenicity. Ice nuclei. "Ice nucleation"

INTRODUÇÃO

A Mancha Branca do milho se destaca entre as principais doenças da cultura, sendo a responsável por consideráveis quebras na produção. Os sintomas se iniciam com a formação de manchas anasarcas no limbo foliar evoluindo para manchas necróticas, podendo variar entre 0,3 e 1cm de diâmetro (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000). A bactéria *Pantoea ananatis*, Gram-negativa, não esporulante, anaeróbia facultativa, de coloração amarelo brilhante, formadora de colônias mucóides e foi descrita por Paccola-Meirelles *et al.* (2001) como sendo o agente causal da doença. Segundo Escanferla *et al.* (2006) esta bactéria pode sobreviver epifiticamente nas folhas de milho e desencadear injúrias em seu hospedeiro por mecanismos ainda não conhecidos. Sabe-se que o aumento da população epifítica sobre folhas de milho está ligado ao pronunciado aumento da doença a campo (WYSMIERSKI; REAL; PACCOLA-MEIRELES, 2006). Esta bactéria é portadora de um mecanismo conhecido como "quorum-sensing" (POMINI; PACCOLA-MEIRELLES, MARSAIOLI, 2006b) que permite o reconhecimento do tamanho populacional através da secreção de substâncias como as acyl homoserine lactonas (RUMJANEK; FONSECA; XAVIER, 2004). Este mecanismo pode estar

associado com a patogenicidade de *P. ananatis* (MOROHOSHI *et al.*, 2007), porém nada é conhecido sobre o papel desempenhado por estas substâncias sinalizadoras.

O fenômeno de nucleação de gelo assume importância em plantas de interesse econômico, devido ao fato de que muitas são incapazes de suportar a formação de gelo em seus espaços intercelulares, causando o fenômeno conhecido por mancha anasarca (ROMEIRO, 2001). Esta característica tem sido observada em isolados de *P. ananatis* quando expostos a baixas temperaturas. O fenótipo de nucleação de gelo é descrito como importante na virulência de bactérias fitopatogênicas e é controlado pelo gene INA (EDWARDS *et al.*, 1994). Há indícios da presença de substâncias nucleantes de gelo na membrana externa da bactéria, sendo estas de origem proteica e capazes de regular a atividade nucleante de gelo em bactérias (KAWAHARA, 2002).

A presente proposta teve por objetivo monitorar a população epifítica de *P. ananatis* sobre folhas de milho e caracterizar esses isolados epifíticos comparando-os com os isolados bacterianos diretamente de lesões foliares. A caracterização desses isolados foi baseada em cultivo em meios seletivos, Biolog e atividade de Nucleação de Gelo.

Materiais e Métodos

Obtenção dos isolados bacterianos

Isolados bacterianos oriundos de lesões da Mancha Branca do Milho foram obtidos conforme a metodologia descrita por Paccola-Meirelles *et al.* (2001). Folhas de milho (*Zea mays*) contendo lesões da Mancha Branca do Milho foram coletadas e lavadas com sabão neutro. As lesões anasarcas foram retiradas e desinfestadas com álcool 70% durante 1 minuto, sendo a seguir colocadas em cloramina T 0,25% durante 4 minutos e lavadas três vezes em água destilada esterilizada durante 1 minuto (cada lavagem). A água da última lavagem foi plaqueada em meio TSA (Tripsoy Soy Agar) para controle da metodologia de desinfestação. Com auxílio de um bisturi esterilizado foram retiradas as bordas

(aproximadamente 1mm) de cada segmento foliar contendo a lesão. As extremidades das lesões foram transferidas para meio TSA. As placas foram incubadas em estufa 30°C + 2°C. As bactérias foram isoladas, purificadas e mantidas em meio TSA. Os isolados epifíticos apresentados na tabela 1 foram obtidos a partir da superfície foliar do milho durante o monitoramento da população epifítica de *P. ananatis* sobre as folhas de milho.

Tabela 1 – Isolados de *Pantoea ananatis* utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Isolados	Origem do material
1010/2*	Sete Lagoas - MG
1010/4*	Sete Lagoas - MG
J503A1*	Sete Lagoas - MG
J505A2*	Sete Lagoas - MG
1D2/95/1*	Sete Lagoas - MG
1D2/95/2*	Sete Lagoas - MG
657/1*	Sete Lagoas - MG
657/2*	Sete Lagoas - MG
E-19*	Reisolamento de casa de vegetação – CCB/UEL – Londrina – PR
EMS05*	Sete Lagoas - MG
WT-2*	Distrito da Warta – Londrina - PR
WT-3*	Distrito da Warta – Londrina - PR
WT7*	Distrito da Warta – Londrina - PR
WT-8*	Distrito da Warta – Londrina - PR
WT9*	Distrito da Warta – Londrina - PR
WT11*	Distrito da Warta – Londrina - PR
F 102-1*	Embrapa Soja - Londrina - PR
F 102-2*	Embrapa Soja - Londrina - PR
F 102-4*	Embrapa Soja - Londrina - PR
F 103-1*	Embrapa Soja - Londrina - PR
F 103-2*	Embrapa Soja - Londrina - PR
F 103-3*	Embrapa Soja - Londrina - PR
F 103-5*	Embrapa Soja - Londrina - PR
F 103-8*	Embrapa Soja - Londrina - PR
101-1**	Embrapa Soja - Londrina - PR
101-2**	Embrapa Soja - Londrina - PR
101-4**	Embrapa Soja - Londrina - PR
101-5**	Embrapa Soja - Londrina - PR

continuação da Tabela 1

102-2**	Embrapa Soja - Londrina - PR
102-3**	Embrapa Soja - Londrina - PR
102-4**	Embrapa Soja - Londrina - PR
102-5**	Embrapa Soja - Londrina - PR
102-6**	Embrapa Soja - Londrina - PR
103-1**	Embrapa Soja - Londrina - PR
103-2**	Embrapa Soja - Londrina - PR
103-3**	Embrapa Soja - Londrina - PR
103-4**	Embrapa Soja - Londrina - PR
103-5**	Embrapa Soja - Londrina - PR
2B710-1**	CCB/UEL – Londrina - PR
2B710-2**	CCB/UEL – Londrina - PR
2B710-3**	CCB/UEL – Londrina - PR
2B710-4**	CCB/UEL – Londrina - PR
2B710-5**	CCB/UEL – Londrina - PR
DAS 657-1**	CCB/UEL – Londrina - PR
DAS 657-2**	CCB/UEL – Londrina - PR
HS 200**	CCB/UEL – Londrina - PR
HS 200-3**	CCB/UEL – Londrina - PR
HS 200-4**	CCB/UEL – Londrina - PR
HS 200-5**	CCB/UEL – Londrina - PR
T1 L2 H-1**	Embrapa Soja - Londrina - PR
T2 L2 B-2 (7)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
T3 L1 B-1**	Embrapa Soja - Londrina - PR
T3 L1 D-2 (7)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E1 L1 B-(1)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E1 L1 B-1 (2)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L1 B1 (3)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L1 B-1 (4)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E1 L1 B-1 (5)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E1 L1 B-1 (6)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E1 L1 B-1 (7)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L1 B-1 (7)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L2 B-1 (7)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L1 D-1 (4)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L2 D-1 (7)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L2 D-3**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L1 H-1 (1)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L1 H-1 (4)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L1 H-1 (7)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E3 L1 H-3 (7)**	Embrapa Soja - Londrina - PR
E2 L1 H-3 (7)**	Embrapa Soja - Londrina - PR

* Isolados obtidos a partir de lesões da Mancha Branca do milho. ** Isolados obtidos a partir da superfície epifítica de folhas da cultura do milho sem a presença de lesões.

Determinação de marcador de resistência

A fim de monitorar a população epifítica de *P. ananatis* sobre a superfície foliar de milho, foi necessário a utilização de um marcador de resistência que permitisse a seleção dos isolados de *P. ananatis* e inibição das demais espécies bacterianas também presentes na superfície foliar.

Foram realizados testes com kit antibiograma no laboratório de Bacteriologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Foram utilizados 5 isolados retirados de leões de *P. ananatis* (WT-8, WT-2, WT-3, E-19, E-4) e 10 antibióticos (Ampicilina, Amicacina, Cefalotina, Cefotaxitina, Cloranfenicol, Gentamicina, Meropenem, Norfloxacin, Sulfazotrin, Tetraciclina). Os discos contendo os antibióticos foram centralizados em placas de Petri contendo meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar) semeado com o patógeno, incubados por 24 horas em BOD a temperatura de 30°C. Para avaliação foram estimados a produção ou não de halos e seus respectivos diâmetros.

Posteriormente, novos testes antibiogramas foram realizados no Laboratório de Genética de Microrganismos (UEL). O protocolo utilizado seguiu os procedimentos descritos por Romeiro (2001).

Os isolados 1010/2, 1010/4, J503A1, J505A2, 1D2/95/1, 1D2/95/2, 657/1, 657/2, E19, WT 7, WT 9, EMS05, F 102-4, F 103-2, F 103-3, F 103-5, F 103-8 foram cultivados em meio TSB (Tryptic Soy Broth) sob agitação constante de 90 RPM a 30°C por 8 horas. Adicionou-se 2mL dessa solução em 9mL de solução salina (NaCl 0,85%) para formulação da suspensão bacteriana. Foram acrescidos 4mL da suspensão bacteriana a 100mL de meio TSA e vertidos em placas de Petri.

Após a solidificação do meio semeado com o patógeno nas placas, foram adicionados sobre sua superfície, discos de papel filtro embedidos nas soluções dos antibióticos testados com três repetições de cada concentração e incubados em BOD a 30°C ± 2 para crescimento. A verificação de halos de inibição do crescimento bacteriano aconteceu 24 horas após incubação.

Utilizou-se para a realização deste teste quatro produtos comerciais com três diferentes doses (Tabela 2). A presença ou ausência de halos inibidores de crescimento foi utilizada como critério avaliador.

Tabela 2 – Antibióticos utilizados no teste antibiograma e suas concentrações utilizadas (mg/mL de meio de cultura).

Antibiótico	Concentração mg/mL em meio TSB*		
Ácido nalidíxico	0,004	0,04	0,4
Eritromicina	0,004	0,04	0,4
Sulfato de estreptomicina	0,004	0,04	0,4
Sulfato de neomicina	0,004	0,04	0,4

*TSB (Tryptic Soy Broth).

Após a constatação do melhor marcador e sua respectiva dosagem, novos testes foram realizados para a confirmação dos resultados.

Utilizou-se 17 isolados de *P. ananatis* os quais foram cultivados em meio TSB, por 8 horas, a 90 RPM a 30°C. A seguir tubos de ensaio contendo 2,5mL de meio TSB acrescidos de 0,1mL das soluções de eritromicina nas concentrações 0,004mg/mL e 0,04mg/mL com três repetições por tratamento foram semeados com uma alíquota de 0,005 mL da cultura bacteriana. Estes tubos foram incubados a 30°C por 12 horas a 90 RPM. O controle consistiu de meio de cultura TSB semeado com o patógeno sem adição do antibiótico. A comparação da turbidez dos tratamentos e do controle foi utilizado como critério de avaliação.

O potencial inibidor de eritromicina para outras espécies bacterianas também foi avaliado, principalmente sobre outras espécies encontradas na superfície foliar. Para isso bactérias epifíticas de diferentes espécies foram isoladas da superfície foliar de milho (*Zea mays*) e da superfície foliar de plantas daninhas encontradas nas áreas de plantio de milho (*Richardia brasilienses*, *Sonchus oleraceous*, *Amaranthus hybridus*, *Parthenium hysterophorus*).

As folhas foram coletadas, em seguida segmentadas e até completar uma massa fresca de 5g. O material obtido foi agitado em 100mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) acrescido de 0,1 (g/v) de peptona bacteriológica e pérolas de vidro por 2 horas, a 30°C, sob agitação constante de 140 RPM. O extrato obtido foi

centrifugado a 4500 RPM por 10 minutos e adequadamente diluído e plaqueado. As bactérias foram selecionadas e diferenciadas de acordo com suas respectivas características morfológicas. As bactérias foram cultivadas em meio TSA em presença dos diferentes antibióticos e suas respectivas doses (Tabela 3). O controle consistiu de meio TSA sem adição do antibiótico. O critério de avaliação utilizado foi a contagem de unidades formadoras de colônia.

Tabela 3 – Antibióticos e suas concentrações utilizadas (mg/mL de meio de cultivo).

Antibiótico	Concentração mg/mL em meio TSB*	
Ácido nalidíxico	0,004	0,04
Eritromicina	0,004	0,04
Sulfato de estreptomicina	0,004	0,04
Sulfato de neomicina	0,004	0,04

*TSA (Tryptic Soy Agar).

Monitoramento da população epifítica de *Pantoea ananatis* sobre as folhas de milho

Os experimentos foram conduzidos no campo experimental da Embrapa Soja, localizada na cidade de Londrina/Pr com coordenadas geográficas 23°11'37" de latitude sul, 51°11'03" de longitude oeste e 613 m de altitude. A semeadura do experimento da safra verão 2008/2009 ocorreu no dia 12 de novembro de 2008 e o experimento da safrinha/2009 foi semeado no dia 18 de junho de 2009. Foram semeados dois híbridos considerados suscetíveis (HS200 e DAS657) e outro considerado resistente (2B710) com três repetições cada.

Na safra verão 2008/2009, as coletas se iniciaram aos 63 dias após a semeadura (DAS) e seguiram semanalmente até o início dos sintomas. Na safrinha/2009, as coletas tiveram início 53 DAS, ocorreram quinzenalmente e se

estenderam até a manifestação natural dos sintomas da doença. Foram coletadas as folhas do 2°, 3°, 4° e 5° nó de 10 plantas, selecionadas aleatoriamente de 3 plantas. As folhas foram segmentadas nas porções apical, mediana e basal em segmentos de 2cm² até completar um peso total de 2,5g de folha fresca. Cada repetição foi separada em dois lotes de segmentos foliares contendo 2,5g cada.

Na safra verão 2008/2009, parte dos segmentos foliares (2,5 g) foram adicionados em 100mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) + 0,1 (g/v) de peptona bacteriológica e pérolas de vidro, e submetidos à agitação constante por 2 horas a 60 RPM à 28°C. Na safrinha/2009, os segmentos foliares foram colocados em 100mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) + 0,1 (g/v) de peptona bacteriológica e pérolas de vidro, deixados em agitação por 2 horas a 140 RPM. Posteriormente a este procedimento para as duas safras, após as 2 horas, o extrato obtido foi filtrado em gaze esterilizado e centrifugado a 4500 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 9mL de solução salina (8,5%). A partir deste procedimento, as amostras foram adequadamente diluídas e aproximadamente 0,1mL foram plaqueados em meio TSA+ Ciclohexamida (0.005mg/mL) e meio TSA+ eritromicina (0,04 mg/ mL) + Ciclohexamida (0.005mg/mL).

No segundo lote, a massa foliar (2,5 g) foi macerada em 25 mL de tampão fosfato (pH 7,0) até a obtenção de um extrato, o qual foi filtrado em gaze esterilizado, diluído adequadamente em solução salina (0,85%) e cerca de 0,1mL da solução foi plaqueado em meio TSA e TSA+ eritromicina (0,04 mg/ mL) + Ciclohexamida (0,005mg/mL).

Utilizou-se 4 replicatas por repetição. As placas foram incubadas a 30°C ± 2 por 48 horas, estimando-se após esse período o número de unidades formadoras de colônias (UFCs). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2x2 (híbridos, processos de extração, tratamentos), seguida pela análise de variância complementada pelo teste de Tukey com três repetições e quando necessário houve transformação dos dados da análise para Log (UFC x 10⁴ + 0,5).

Caracterização dos isolados de *Pantoea ananatis*: isolados epifíticos vs. isolados obtidos diretamente de lesões

Após a obtenção de isolados da lesão e de isolados selecionados com base nas características morfológicas oriundos do monitoramento da população epifítica, os mesmos foram submetidos à testes para confirmação da espécie do agente causal da doença. As colônias bacterianas foram caracterizadas quanto à presença de pigmento amarelo e morfologia em meio TSA, reação Gram e utilização de sorbitol e glicerol. Adicionalmente os isolados foram avaliados quanto ao perfil de BIOLOG para utilização de 95 fontes de carbono. Finalmente os isolados foram testados quanto a atividade de nucleação de gelo.

Caracterização quanto utilização de sorbitol e glicerol:

Os isolados foram cultivados em presença de sorbitol e glicerol conforme descrição feita por Schaad, Jones e Chun (2001) e incubados por sete dias em BOD à 30°C até o período de avaliação. O critério de avaliação utilizado foi a alteração da coloração dos meios de cultura, de roxo para amarelo. *P. ananatis* utiliza sorbitol e glicerol como fontes de carbono.

Caracterização quanto à utilização de diferentes fontes de carbono (Biolog)

O sistema Biolog tem sido utilizado com sucesso para identificação e caracterização de fitopatógenos, baseando-se em perfis metabólicos (JONES *et al*, 1993). Este teste permite avaliar o grau de similaridade entre as populações bacterianas isoladas da superfície foliar e aquelas isoladas diretamente das lesões da Mancha Branca do Milho. Foram selecionados 15 isolados para serem testados em Microplaca GN2 - Biolog catalogo 1101 para 95 diferentes fontes de Carbono. Os isolados foram cultivados em meio NA (Nutriente Agar) e posteriormente inoculados

nas placas de acordo com a metodologia descrita por Marriel *et al.* (2004). Após incubação à 30°C verificou-se o crescimento dos isolados em cada fonte de Carbono.

Determinação da atividade de nucleação de gelo dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio TSB por 24 horas e incubados a 30°C sob agitação constante de 60 RPM. Após esse período o material foi homogeneizado em vortex e 0,1mL do cultivo foram adicionados à tubos de ensaio contendo 1mL de água destilada esterilizada, os quais encontravam-se acondicionados em banho de gelo, com temperatura externa abaixo de -10°C por aproximadamente 2 minutos. A formação de gelo instantânea no tubo ao acrescentar a solução bacteriana, revelou o fenótipo INA positivo do isolado. Foram submetidos a teste 48 isolados, dos quais 8 foram isolados de lesões da Mancha Branca do Milho e os restantes da superfície epifítica da cultura. O controle consistiu na adição de meio TSB livre de bactéria nos tubos contendo água destilada estéril.

Microscopia eletrônica de transmissão

Os isolados WT2 e WT11 foram cultivados em meio TSB (controle) e em meio TSB acrescido de 2,5% de glicerol (v/v) por um período de 12 horas, sob agitação constante de 60 RPM e a 30°C. Em seguida, o meio foi centrifugado a 13000 RPM por 15 minutos, para se obter células isoladas do meio de cultura. As células foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) a temperatura ambiente por 12 horas. O material foi lavado em tampão cacodilato 0,1M, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas a temperatura ambiente e novamente lavado no mesmo tampão. As amostras foram desidratadas em séries de etanol com concentrações crescentes, embebidas e emblocadas em resina Araldite®. Cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos em ultramicrótomo (Ultracut - Leica) com navalha de diamante (Diatome 2 mm e 45°).

Os cortes foram montados em telas de 200 mesh e contrastados em acetato de uranila (2%) e citrato de chumbo (Solução de Reynolds). As telas foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (Fei Tecnai 12) do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina (PPG/UEL).

Testes de patogenicidade

Teste de patogenicidade em casa de vegetação

O trabalho foi desenvolvido na casa de vegetação localizada no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL) com coordenadas geográficas 23 °23 ' de latitude S e 51 ° 11 ' de longitude W, altitude média 566m.

Os testes de patogenicidade foram realizados no cultivar suscetível DAS657 em plantas com aproximadamente 35 dias de idade. Os isolados bacterianos utilizados foram WT2, WT7 E WT11. A unidade experimental utilizada foram vasos em triplicata, cada vaso contendo três plantas de milho. O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados foram transformados para raiz quadrada de $(x+0,5)$ devido a presença de valores nulos. Um pré-inóculo foi preparado cultivando-se cada isolado em meio TSB por 12 horas a 30° C à 60 RPM. Após este período 1,0 mL do pré inóculo foi transferido para 100 mL de meio TSB e incubado nas condições anteriores por 4 horas (inóculo). Antes da inoculação, a cultura bacteriana foi acrescida de solução salina (0,85%) na proporção de 1:1 e permaneceu a uma temperatura de 4°C durante 2 horas, antes de ser inoculada nas folhas. As folhas foram injuriadas suavemente com esponja do tipo "lava-louças" e imediatamente pulverizadas com a suspensão bacteriana. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 horas. Como controle utilizou-se apenas o meio TSB também diluído em solução salina na proporção de 1:1.

Teste de patogenicidade em laboratório

Os testes de patogenicidade no laboratório foram realizados com folhas destacadas do cultivar suscetível DAS657 em plantas com aproximadamente 35 dias de idade. Os isolados bacterianos utilizados foram WT2, WT7 E WT11. Foram utilizadas três repetições por tratamento, e o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Houve necessidade de transformação dos dados para raiz quadrada de $(x+0,5)$, visto que havia a presença de valores nulos. Para os testes de patogenicidade em laboratório as folhas foram destacadas, lavadas, injuriadas com esponja e prensadas em câmaras de microumididade (CM), contendo 12 poços de 0,3 cm de diâmetro. A área foliar correspondente à cada poço recebeu cinco furos com agulha de 2mm de diâmetro.

O inóculo foi preparado conforme descrito anteriormente. As inoculações foram feitas com micropipetas. Como controle utilizou-se apenas o meio TSB também diluído em solução salina na proporção de 1:1. Após as inoculações o material foi acondicionado em câmara úmida por 72 horas.

Resultados e Discussão

Definição do marcador de resistência

Todos os antibióticos descritos na Tabela 4 foram capazes de promover o controle da bactéria, sendo estes resultados indicadores da sensibilidade de *P. ananatis* aos mesmos.

Tabela 4 – Diâmetro dos halos (mm) observados quando isolados de *P. ananatis* (Mancha Branca do Milho) foram submetidos aos testes de inibição em presença de diferentes antibióticos.

Antibióticos	Isolados				
	WT-8	WT-2	WT-3	E-19	E-4
Amicacina	32	30	30	30	30
Ampicilina	17	19	19	22	20
Cefalotina	19	22	25	28	18
Cefotaxitina	***	***	***	***	***
Cloranfenicol	30	30	30	26	30
Gentamicina	33	31	30	25	27
Meropenem	35	32	35	35	36
Norfloxacina	32	30	30	28	28
Sulfazotrin	40	35	37	35	40
Tetraciclina	29	30	27	25	30

*** (Isolados de *Pantoea ananatis* completamente sensíveis ao antibiótico).

Devido à sensibilidade de *P. ananatis* obtida anteriormente, realizou-se o segundo teste antibiograma objetivando encontrar um produto no qual *P. ananatis* se desenvolvesse em sua presença inibindo outras espécies. Observou-se que dentre os quatro antibióticos testados, eritromicina foi o único em que *P. ananatis* mostrou-se resistente para todos os isolados em todas as doses e suas repetições (Figura 1 e Tabela 5). Diante dos resultados preliminares, eritromicina foi

selecionada para novos testes comprobatórios aos objetivos do trabalho e para determinação da concentração adequada a ser utilizada.

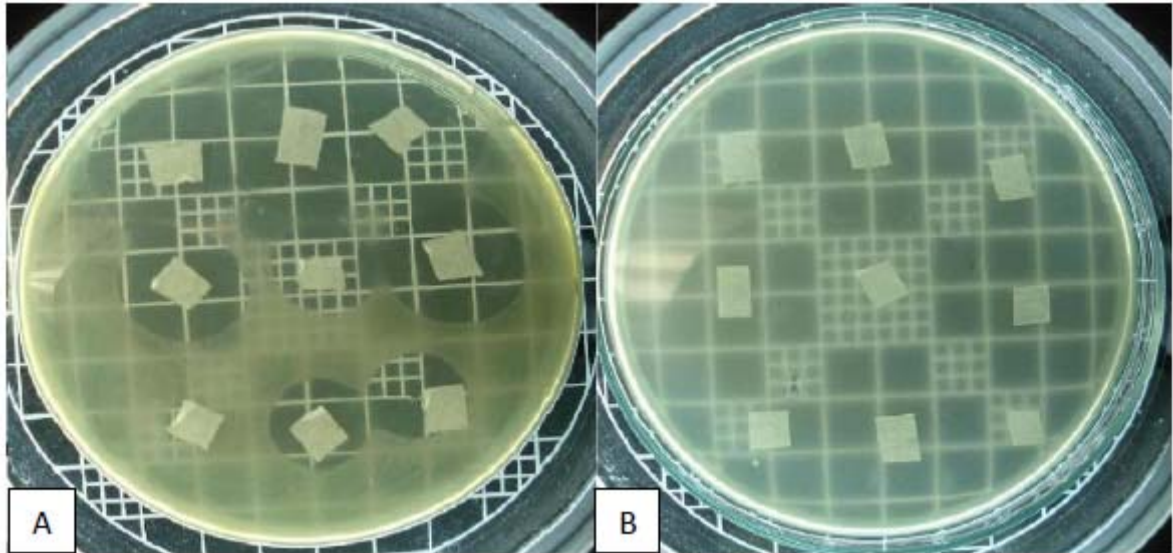


Figura 1 – Teste antibiograma. (A) comportamento do isolado 657/1 na presença de ácido nalidixico (0,04 mg/mL). (B) comportamento do isolado F 102-4 na presença de eritromicina (0,4 mg/mL).

Tabela 5 – Suscetibilidade de *Pantoea ananatis* aos antibióticos testados em suas diferentes concentrações.

Isolado	Antibióticos (mg/mL)																																
	Ácido Nalidíxico			Eritromicina			Sulfato de neomicina			Sulfato de Streptomicina																							
	0,4	0,04	0,004	0,4	0,04	0,004	0,4	0,04	0,004	0,4	0,04	0,004																					
1010/2	S	S	S	S	S	R*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
1010/4	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
J503A1	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	
J505A2	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
1D2/9																																	
5/1	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	
1D2/9																																	
5/2	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	
657/1	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
657/2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E 19	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R
WT7	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
WT9	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R
EMS05	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S
F 102-4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
F 103-2	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
F 103-3	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F 103-5	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
F 103-8	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

*S (sensível). ** R (resistente).

Os testes realizados em meio líquido (TSB), também permitiram observar que a maior concentração utilizada foi capaz de inibir total ou consideravelmente o crescimento de *P. ananatis* para alguns dos isolados submetidos ao teste (Figura 2 e Tabela 6). Considerou-se que as melhores concentrações finais do marcador selecionado foram as duas menores (0,04mg/mL e 0,004mg/mL), restando saber ainda qual delas seria capaz de melhor inibir outras bactérias contaminantes ou de morfologia semelhante à *P. ananatis* contidas na superfície epifítica de milho, sem inibir o agente bacteriano em estudo.

Tabela 6 – Teste de resistência de diferentes isolados de *Pantoea ananatis* ao antibiótico eritromicina em meio líquido TSB (Tryptic Soy Both) em três diferentes concentrações.

Isolados	Eritromicina (mg/mL)								
	0,4			0,04			0,004		
1010/2	S *	S	S	R**	R	R	R	R	R
1010/4	S	S	S	R	R	R	R	R	R
J503A1	R-***	R-	R-	R	R	R	R	R	R
J505A2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1D2/95/1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1D2/95/2	R-	R-	R-	R	R	R	R	R	R
657/1	R-	R-	R-	R	R	R	R	R	R
657/2	R-	R-	R-	R	R	R	R	R	R
E 19	R-	R-	R-	R	R	R	R	R	R
WT7	R-****	R--	R--	R	R	R	R	R	R
WT9	S	S	S	R	R	R	R	R	R
EMS05	R-	R-	R-	R	R	R	R	R	R
F 102-4	R-	R-	R-	R	R	R	R	R	R
F 103-2	R-	R-	R-	R	R	R	R	R	R
F 103-3	R--	R--	R--	R	R	R	R	R	R
F 103-5	R-	R-	R-	R	R	R	R	R	R
F 103-8	R-	R-	R-	R	R	R	R	R	R

*S (sensível). ** R (resistente). *** R- (menor turbidez em comparação com a concentração 1mg/mL).

**** R-- (inibição considerável do crescimento bacteriano).

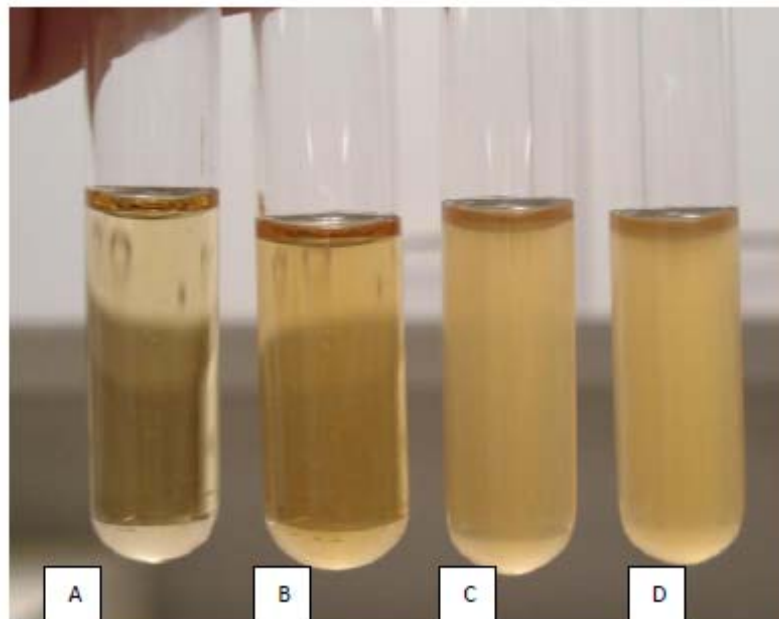


Figura 2 – Teste com o antibiótico eritromicina em diferentes concentrações em meio líquido TSB (Tryptic Soy Both). (A) (controle - TSB). (B) (TSB + isolado 1010/2 + eritromicina 0,4mg/mL). (C) (TSB + isolado 1010/2 + eritromicina 0,04mg/mL). (D) (TSB + isolado 1010/2 + eritromicina 0,004 mg/mL).

O potencial inibidor de eritromicina para outras espécies bacterianas foi avaliado e a dose na concentração final de 0,04mg/mL de meio de cultura, foi a mais adequada para controlar o crescimento de espécies distintas de *P. ananatis*.

Monitoramento da população epifítica de *Pantoea ananatis* sobre folhas de milho

Na safra 2008/2009, foi possível observar um aumento geral da população epifítica de *P. ananatis* durante o período de avaliação. Este crescimento populacional foi evidente na quarta coleta, onde as plantas apresentavam-se com 84 dias após a semeadura (DAS), período este que coincidiu com a manifestação dos sintomas da doença à campo nos híbridos avaliados. Embora houvesse variações nas médias das unidades formadoras de colônia, o aumento da população epifítica de *P. ananatis* foi verificado nos dois processos de extração da bactéria, a extração por agitação e a extração por maceração foliar, confirmando que *P. ananatis* habita epifiticamente as folhas de milho. O progresso da população bacteriana foi verificado também no híbrido 2B710, considerado resistente, embora a manifestação dos sintomas a campo tenha sido observada mais intensamente nos híbridos DAS 657 e HS 200 (figura 3).

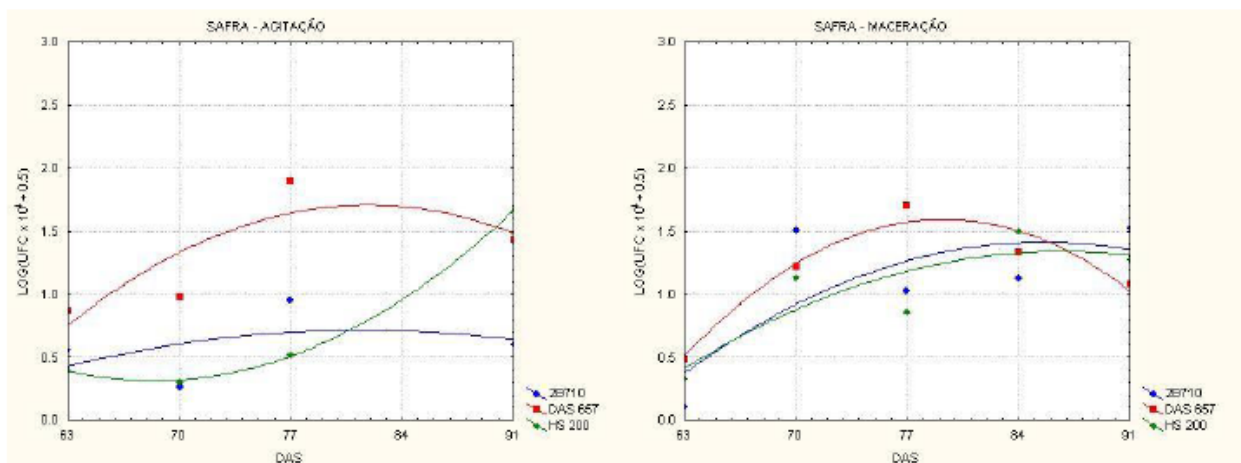


Figura 3 – Desenvolvimento da população epifítica de *Pantoea ananatis* na cultura do milho através das médias das unidades formadoras de colônias sob dois diferentes processos de extração bacteriana na safra 2008/2009.

Na safrinha de milho 2009, observou-se que a população epifítica bacteriana apresentou-se bastante alta na primeira coleta, em especial para o processo de agitação (Figura 4). No decorrer do trabalho foi possível observar que houve redução no tamanho populacional. Para o processo de maceração, foi possível observar que o decréscimo populacional observado coincide com o período em que a doença se manifestou a campo, aos 98 DAS. Embora a doença tenha se manifestado no período que coincide com a quarta coleta da safrinha, as quedas no progresso populacional foram observadas também neste período.

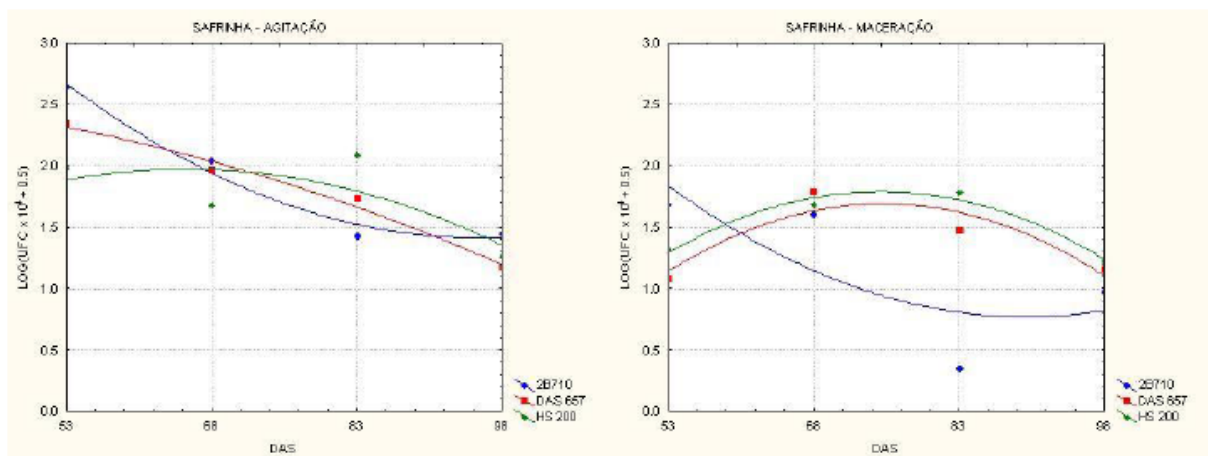


Figura 4 – Desenvolvimento da população epifítica de *Pantoea ananatis* na cultura do milho através das médias das unidades formadoras de colônias sob dois diferentes processos de extração na safrinha 2009.

Observou-se uma variação muito grande no tamanho da população epifítica entre as coletas, contrariando os resultados observados por Wysmierski, Real e Paccola-Meirelles (2006). Essa variação pode ser atribuída a uma distribuição desuniforme de *P. ananatis* sobre a superfície foliar do milho. Isto sugere que as bactérias possam estar concentradas e agrupadas em certas localidades da folha. Diferenças entre o tamanho populacional nos diferentes processos de extração foram observadas. Morris, Monier e Jacques (1998) relatam a dificuldade em remover todas as bactérias encontradas na superfície foliar através de lavagem por agitação. Dificuldades semelhantes também foram encontradas em nosso trabalho, demonstrando a necessidade de melhorias na metodologia utilizada, como por exemplo, ao invés de amostragem através de segmentação, a utilização da folha inteira seria mais adequada, evitando deste modo grandes variações nos resultados.

Plantas hospedeiras de bactérias fitopatogênicas sobre as folhas porém assintomáticas, podem funcionar como fonte de inóculo no campo. Daí a importância de se estudar as populações epifíticas presentes em genótipos suscetíveis e resistentes, em diversas espécies hospedeiras. A condição epifítica de algumas espécies bacterianas pode representar um mecanismo desenvolvido por essas espécies para evitar a destruição de seu habitat quando do surgimento da lesão, que é considerado totalmente desfavorável ao patógeno (HIRANO; UPPER, 2000).

O controle da expressão de virulência, sobrevivência e patogenicidade de várias espécies bacterianas é controlado pelo fenômeno de "quorum-sensing" (PEARSON *et al.*, 1994), um mecanismo de comunicação intercelular que permite a percepção da densidade populacional entre as bactérias. Este fenômeno já foi relatado para bactérias do gênero *Pantoea* (RUMJANEK; FONSECA; XAVIER, 2004; POMINI; ARAUJO; MARSAIOLI, 2006a; POMINI, PACCOLA-MEIRELLES; MARSAIOLI, 2006b).

Wysmierski, Real e Paccola-Meirelles (2006) observaram que os sintomas da doença Mancha Branca do Milho surgem somente após um pronunciado aumento da população de *P. ananatis* sobre as folhas. A baixa população epifítica foliar de *P. ananatis* reflete em uma baixa incidência da doença no campo. Segundo Lindemann, Arny e Upper (1984) a ocorrência de uma doença está relacionada com um acentuado aumento da população epifítica, que por sua vez pode estar associada à intensidade e frequência de cultivo da espécie hospedeira.

Para Hirano e Upper (2000), a incidência da doença está relacionada ao aumento da população epifítica e variações no tamanho da densidade populacional podem ser atribuídas ao ambiente. Parâmetros ambientais podem afetar o crescimento bacteriano epifítico sem influenciar na suscetibilidade do hospedeiro. Estes fatores ambientais possuem maior impacto sobre a dinâmica de população epifítica do que sobre a suscetibilidade do hospedeiro (ROUSE *et al.*, 1985).

Sob condições de baixa umidade relativa, agregado bacterianos epifíticos são menos numerosos ou menores que agregados mantidos sob condições de maior umidade (MONIER; LINDOW, 2004). Fatores como linhagem,

plantas e ambientes físicos, bem como luz e umidade, podem determinar o tamanho da população epifítica (O'BRIEN; LINDOW, 1989).

Na safra 2008/2009, entre os híbridos, observou-se diferenças significativas nas coletas 3 e 4 (Tabela 7), sendo estes, os mesmos períodos nos quais se observou na figura 3, o aumento expressivo da população bacteriana.

Também para a safrinha 2009, os dados entre as coletas não se mostraram homogêneos, indicando que possivelmente as bactérias se agruparam e sua distribuição sobre a folha não foi uniforme, isto sugere também que a metodologia necessita de ajustes para melhor obtenção de resultados. Os resultados não apresentam interações significativas entre os fatores, portanto, os mesmos foram avaliados separadamente (tabela 8). Os dados pluviométricos durante o período do experimento encontram-se no Anexo.

Tabela 7 – Análise de variância e médias do tamanho da população epifítica de *Pantoea ananatis* através da contagem das unidades formadoras de colônias na Safra verão 2008/2009 em diferentes períodos de coleta de material para extração.

Safra 2008/2009						
Dados Transformados em Log (UFC x 10 ⁴ +0,5)						
Fontes de variação	Grau de liberdade	Valor de F				
		Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5
Híbrido	2	0,72	1,11	4,45*	4,24*	0,87
Processo	1	0,48	15,09*	1,52	7,14*	0
Tratamento	1	45,19*	3,26	0,29	0,86	23,13*
Híbrido x Processo	2	0,42	0,34	0,03	4,91*	1,92
Híbrido x Tratamento	2	1,15	0,07	2,38	0,01	0,53
Processo x Tratamento	1	1,85	0,31	0,68	0,78	0,25
Híbrido x Processo x Tratamento	2	0,45	1,21	1,02	0,36	2,75
Média	-	18,97	20,60	39,23	10953,19	82,35
C.V. (%)	-	46,23	49,24	45,14	47,08	26,91

Médias seguidas de diferentes letras na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey.
*Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Tabela 8 – Análise de variância e médias do tamanho da população epifítica de *Pantoea ananatis* através da contagem das unidades formadoras de colônias na Safrinha 2009 em diferentes períodos de coleta de material para extração.

Safrinha 2009					
Dados Transformados em Log (UFC x 10 ⁴ +0,5)					
Fontes de variação	Grau de liberdade	Valor de F			
		Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Híbrido	2	0,11	0,21	11,11*	1,49
Processo	1	6,14*	0,39	7,65*	8,91*
Tratamento	1	71,36*	8,12*	23,47*	77,72*
Híbrido x Processo	2	1,59	0,09	0,02	0,64
Híbrido x Tratamento	2	1,44	0,42	0,60	1,82
Processo x Tratamento	1	0,68	0,04	0,31	3,22
Híbrido x Processo x Tratamento	2	0,86	0,55	3,39	0,42
Média	-	116434,70	1867,06	178,83	346,28
C.V. (%)	-	28,40	34,34	24,56	23,88

Médias seguidas de diferentes letras na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey.

*Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Caracterização dos isolados de *Pantoea ananatis*: isolados epifíticos vs. isolados obtidos diretamente de lesões

As colônias isoladas da superfície epifítica de milho e aquelas isoladas diretamente das lesões da Mancha Branca do Milho apresentaram pigmentação amarela, foram Gram-negativas e positivas nos testes de utilização de sorbitol e glicerol como fontes de carbono. Estas características são típicas da espécie *P. ananatis*, e permitiram diferenciar esses isolados daquelas espécies semelhantes tais como *P. stewartii* e *P. agglomerans*. Esses resultados são discutidos abaixo.

Caracterização quanto a utilização de sorbitol e glicerol

Em geral as espécies pertencentes ao gênero *Pantoea* apresentam pigmentação amarela, mas comportam-se de maneira distinta quanto a formação de ácido a partir de glicerol e sorbitol. As espécies *P. agglomerans*, *P. stewartii* e *P. ananatis*, apresentam coloração amarela e morfologia que podem ser confundidas entre si. No entanto as duas primeiras não utilizam o glicerol e o sorbitol como fontes de carbono, enquanto que a *P. ananatis* utiliza esses carboidratos, produzindo um ácido durante este processo o qual altera a coloração do meio de cultura (de azul para amarelo - Figuras 5 e 6) (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). Assim, com o objetivo de confirmar se os isolados oriundos da população epifítica da folha, pertenciam realmente à espécie *P. ananatis*, foram selecionados ao acaso 24 isolados epifíticos e 10 isolados de lesão os quais foram submetidos ao teste de crescimento em fontes de carbono sorbitol e glicerol. As amostras submetidas à teste foram em sua maioria positivas para a utilização das fontes de carbono utilizadas neste experimento (Tabela 9 e Figura 5 e 6). A produção de ácido a partir de glicerol, foi um dos critérios utilizados na distinção de espécies do gênero *Pantoea* e na transferência de sua nomenclatura (MERGAERT; VERDONCK; KERSTERS, 1993).

Tabela 9 – Identificação de *Pantoea ananatis* através de meio de cultura semi-seletivo a base de glicerol e sorbitol.

Isolados	Sorbitol	Glicerol
F 103-1	+	+
F 103-3	+	+
F 103-5	+	+
K1	+	+
K3	+	+
WT2	+	+
WT7	+	+
WT8	+	+
WT11	+	+
WT14	+	+
102-3	+	+
102-6	+	+
103-4	+	+
2B710- 5	+	+
DAS657-1	+	+
T1 L2 H-1	+	+
T2 L2 B-2	+	+
T3 L1 B-1	+	+
T3 L1 D-2 (7)	+	+
E1 L1 B1 (1)	+	+
E1 L1 B1 (2)	+	+
E1 L1 B1 (6)	+	+
E1 L1 B1 (7)	+	+
E3 L1 B-1 (7)	+	+
E3 L2 B-1 (7)	+	+
E3 L1 D-1	+	+
E3 L2 D-1 (7)	+	+
E3 L2 D-3	+	+
E3 L1 B1 (7)	+	+
E3 L1 H1 (1)	+	+
E3 L1 H1 (4)	+	+
E3 L1 H-1 (7)	+	+
E3 L1 H-3 (7)	+	+
E3 L2 H-3	+	+
CONTROLE	-	-

(+) Mudança de coloração: amarelo. (-) Inalteração da cor.

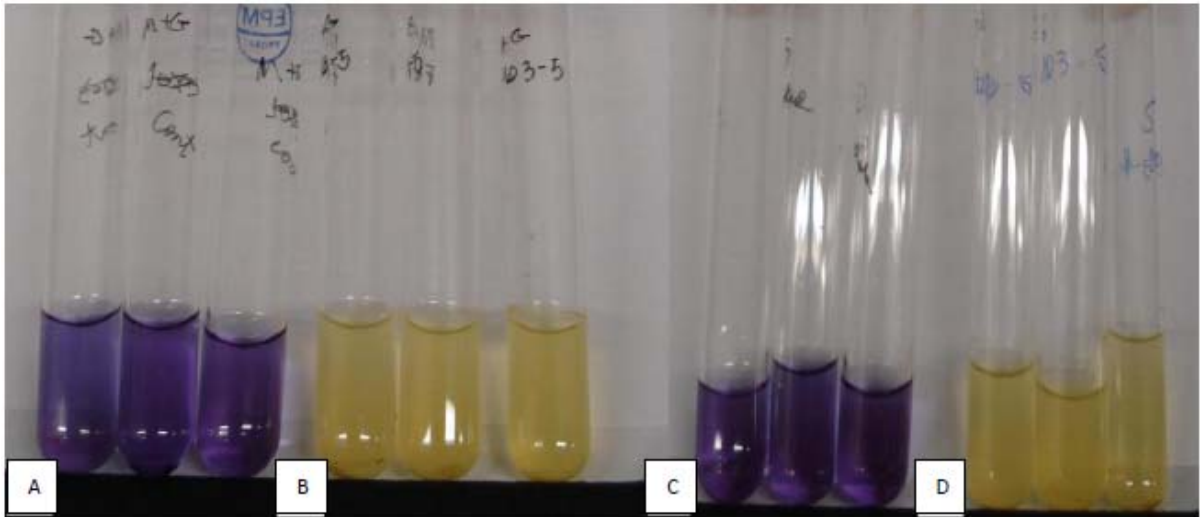


Figura 5 – Caracterização dos isolados de *P. ananatis* quanto a utilização de glicerol e sorbitol como fonte de carbono. Isolado obtido da lesão da Mancha Branca do Milho. (A) Controle - glicerol. (B) Isolado F 103-5 na presença de glicerol. (C) Controle - sorbitol. (D) Isolado F 103-5 na presença de sorbitol.

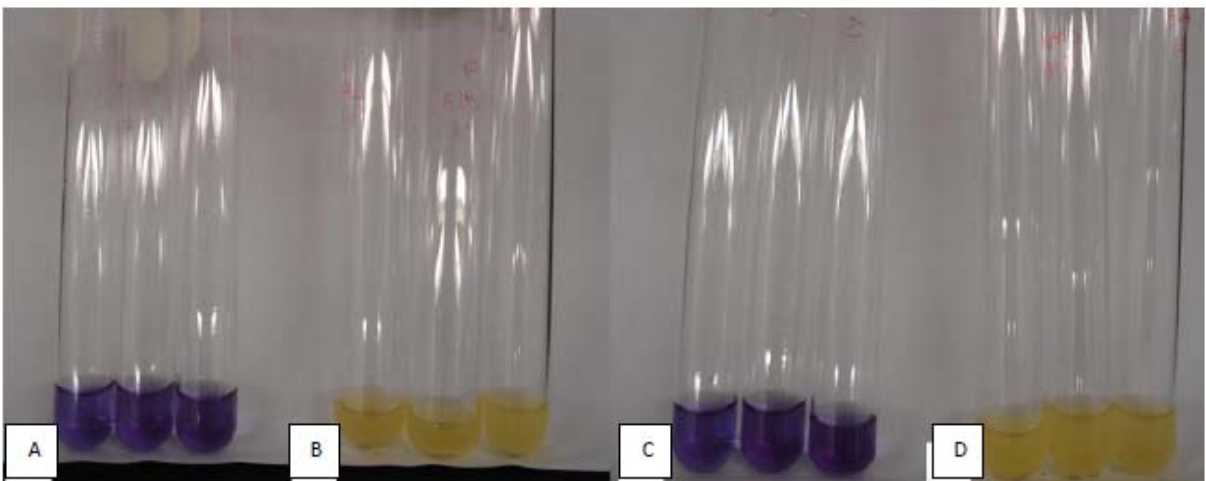


Figura 6 – Caracterização dos isolados de *P. ananatis* quanto a utilização de glicerol e sorbitol como fonte de carbono. Isolado obtido da superfície epifítica de folhas da cultura do milho. (A) Controle - glicerol. (B) Isolado E3 L2 H-3 na presença de glicerol. (C) Controle -sorbitol. (D) Isolado E3 L2 H-3 na presença de sorbitol.

Caracterização quanto à utilização de diferentes fontes de carbono (Biolog)

A técnica de identificação do sistema Biolog (Biolog Inc. ayward, CA) permite avaliar simultaneamente a atividade metabólica de uma linhagem bacteriana

em 95 diferentes fontes de carbono, incluindo aminoácidos, ácidos carboxílicos e carboidratos. Os resultados dessa identificação geram um dendrograma que mostra a relação entre as linhagens avaliadas, permitindo um agrupamento entre elas de acordo com sua similaridade metabólica. Assim o Biolog tem sido muito utilizado na caracterização e identificação de bactérias (BOUZAR *et al.*, 1993)

Os resultados obtidos da análise de agrupamento dos isolados através do dendrograma de similaridade, a utilização da fontes de carbono pelos isolados revelou a existência de apenas um grande grupo, este, constituído por vários subgrupos, onde apenas o isolado E3L2H1 apresenta-se agrupado separadamente (Figura 7). Dos 15 isolados estudados, 10 apresentaram coeficiente de similaridade de aproximadamente de 80%.

Não houve distinção entre grupos dos isolados obtidos de lesões da Mancha Branca do milho e de isolados obtidos da superfície epifítica. Os isolados F 103-1 e T3L2B1, oriundos da lesão e da superfície epifítica respectivamente, podem exemplificar a não distinção entre a origem destes isolados, confirmando a semelhança entre os isolados.

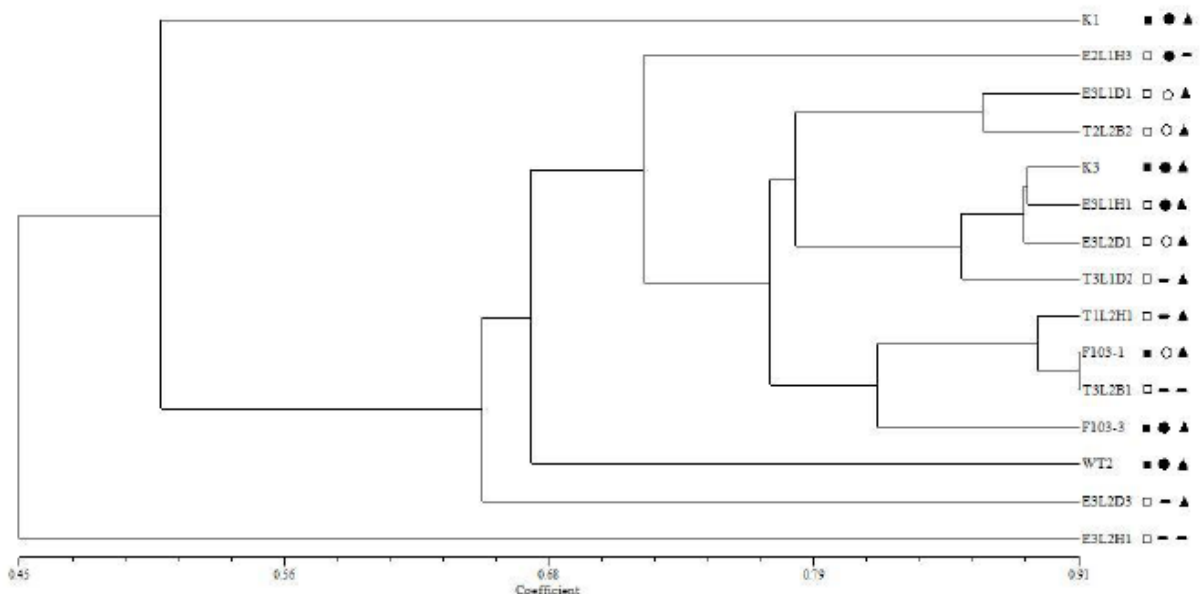


Figura 7 – Dendrograma mostrando a relação entre 15 isolados de *P. ananatis* oriundos da superfície foliar e aqueles obtidos diretamente das lesões da Mancha Branca do Milho, baseado na utilização diferencial das 95 fontes de carbono disponíveis nas Microplacas de Biolog GN. Isolados diretamente da lesão (■). Isolados epifíticos (□). Isolados INA+ (●). Isolados INA- (○). Isolados positivos para utilização de sorbitol e glicerol como fontes de carbono (▲). Isolados não testados para esta característica (■).

Determinação da atividade de nucleação de gelo dos isolados bacterianos e microscopia eletrônica de transmissão

Foram caracterizados para atividade de nucleação de gelo 51 isolados. Dos 11 isolados diretamente de lesões da Mancha Branca do milho, 8 deles apresentaram atividade INA+. Dos 40 isolados da superfície epifítica, 27 manifestaram atividade de nucleação de gelo (Tabela 10). Isto demonstra que a atividade de nucleação de gelo é dependente do isolado e de suas características genotípicas. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Escanferla *et al.* (2005; 2006), Wysmierski, Escanferla e Paccola-Meirelles (2005) e Wysmierski; Real, Paccola-Meirelles (2006) em isolados obtidos de lesões da Mancha Branca do milho. Essa variação entre isolados também foi observada por Lindow *et al.* (1982). Estes autores descreveram que nem todas as células de um isolado INA podem servir como um nucleante de gelo em qualquer tempo e temperatura. Eles também observaram que a frequência de nucleação de gelo variou com vários fatores, como a temperatura de incubação da bactéria, com o meio de crescimento, com a idade da cultura e com o genótipo da bactéria.

Várias espécies de bactérias são capazes de catalizar a formação de gelo em temperaturas que normalmente isto não ocorreria. Estes microrganismos catalizam de forma eficiente a formação do gelo em temperaturas muito mais altas que muitas substâncias orgânicas ou inorgânicas (GURIAN-SHERMAN; LINDOW, 1993).

A presença dessas bactérias na superfície de plantas sensíveis ao frio, poderia ser o fator responsável por iniciar a formação de gelo causando injúrias na planta.

Desde a descoberta das bactérias INA nos anos 70 (MAKI *et al.*, 1974) muito tem se estudado na tentativa de esclarecer o papel dessas bactérias. De acordo com Lindow (1983), a presença de um gene específico, seria um fator responsável pela manifestação desta característica. Este fenótipo possui um importante papel na virulência destas espécies (EDWARDS *et al.*, 1994). A atividade de nucleação de gelo está fortemente correlacionada com a capacidade de estimular a ocorrência de doença por quedas de temperatura, sendo uma das propriedades necessária para ocasionar danos às plantas (LINDOW *et al.*, 1982). Os danos às

plantas ocorrem devido a formação de gelo nos espaços intercelulares em temperaturas onde este fenômeno normalmente não ocorreria (LINDOW *et al.*, 1982; LINDOW, 1987).

Segundo Hirano *et al.* (1985) o cultivo seqüencial de diferentes linhagens de *Pseudomonas syringae* em condições idênticas resultou em frequências diferentes de nucleação de gelo. A base para essa variabilidade é desconhecida.

Moléculas de proteínas e materiais localizados na membrana externa de algumas espécies bacterianas, são consideradas por Kawahara (2002), responsáveis pela nucleação de gelo. Substâncias nucleantes de gelo podem estar relacionadas a fosfolipídios e a outros fatores ligados a proteínas (ROMEIRO, 2001). Algumas destas proteínas localizadas na membrana externa, podem desencadear danos às plantas (LINDOW, 1983). Deste modo, os isolados WT2 e WT11 provenientes da lesão, apresentaram fenotipo INA+ e foram selecionados para observação desta característica através de microscopia eletrônica de transmissão. Sobre a parede celular, foram observadas estruturas semelhantes (Figura 8) às descritas em outras espécies bacterianas e apresentadas por Phelps *et al.* (1986), Kawahara (2002) e Michigami *et al.* (1995). Estas estruturas são caracterizadas por estes autores como vesículas protéicas, as quais seriam responsáveis pela liberação dos núcleos de gelo. As vesículas demonstraram-se em maior número quando a bactéria foi cultivada em meio acrescido de glicerol (Figura 8 B e C), sendo esta constatação feita para os dois isolados observados. Este resultado corrobora com os obtidos anteriormente por Lindow *et al.* (1982), onde verificou-se que mais núcleos de gelo foram produzidos quando glicerol foi adicionado ao meio de cultura utilizado. A adição de glicerol ao meio é considerada um dos fatores determinantes para proporcionar condição ótima de produção de núcleos de gelo em incubação *in vitro*. O glicerol, quando adicionado ao meio de cultivo pode contribuir com o aumento na nucleação do gelo (LINDOW, *et al.*, 1982; WYSMIERSKI; REAL; PACCOLA-MEIRELES, 2006). As vesículas observadas não apresentaram diferenças estruturais quando as células cultivadas em meio NB e em meio NB acrescido de glicerol.

Infelizmente, a função e estrutura destas proteínas ainda tem sido pouco exploradas, dificultando a caracterização de bactérias que expressam este fenótipo (KAWAHARA, 2002).

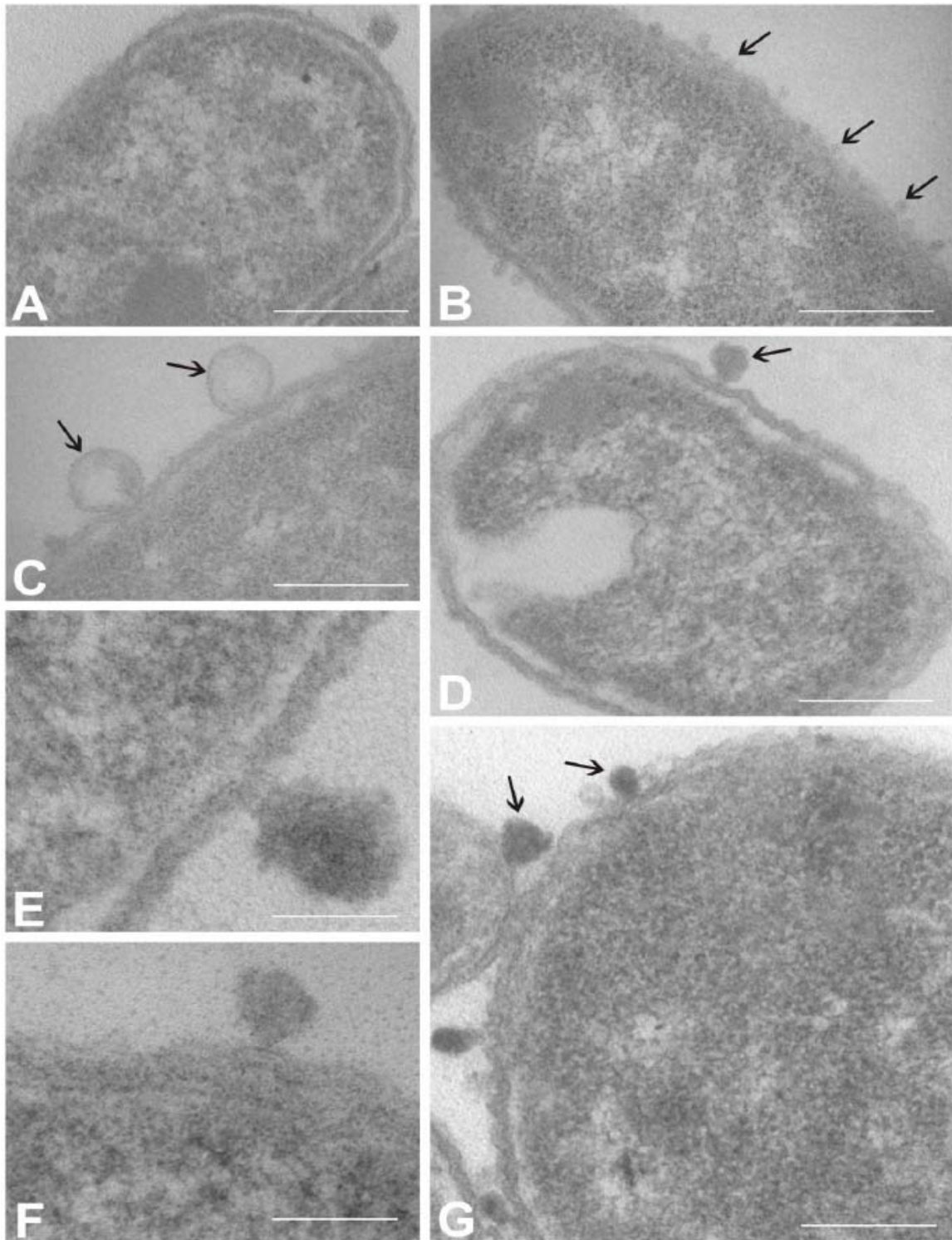


Figura 8 – Eletromicrografias de transmissão de células de *Pantoea ananatis*, isolada de lesões anasarcas da Mancha Branca do Milho, mostrando a presença de vesículas protéicas responsáveis pela liberação de núcleos de gelo (setas). **(A)** Isolado WT2 - cultivado em meio NB, mostrando a formação de uma única vesícula na região apical da célula. **(B)** e **(C)** Isolado WT2 - cultivado em meio NB+Glicerol, observar o aumento no número de vesículas (setas) em relação ao controle. **(D)** e **(E)** WT11 - controle com presença de apenas uma vesícula. **(F)** e **(G)** WT11 - em meio NB+Glicerol notar o aumento no número de vesículas (setas) quando comparado com o controle. As vesículas tanto em glicerol quanto o controle apresentam as mesmas características ultraestruturais. (A), (B), (C), (D) e (G) Aumento 97.000X e barra de 200nm. (E) e (F) aumento de 235.000X e barra de 100nm.

Tabela 10 – Atividade de nucleação de gelo dos isolados de *Pantoea ananatis*

Isolado	UFC/mL (10⁷)	INA
F 103-1*	42,50	-
F 103-2*	121,00	+
F 103-3*	64,25	+
F 103-5*	193,50	+
F 103-8*	42,90	-
F 102-1*	79,25	+
F 102-2*	1284,00	-
F 102-4*	292,75	+
WT2*	275	+
WT7*	7,67	+
WT11*	11900	+
101-1**	27,30	+
101-2**	50,03	+
101-4**	39,55	-
101-5**	42,80	-
102-2**	64,75	-
102-3**	19,50	+
102-4**	18,33	+
102-5**	1518,00	+
102-6**	248,00	+
103-1**	21,23	+
103-2**	174,50	+
103-3**	562,75	-
103-4**	24,95	-
103-5**	74,55	-
2B710-1**	392,00	+
2B710-2**	237,25	+
2B710-3**	50,45	+
2B710-4**	73,50	+
2B710-5**	1013,50	+
DAS 657-1**	114,25	+
DAS 657-2**	28,35	+

continuação da Tabela 10

HS 200**	196,50	+
HS 200-3**	27,00	-
HS 200-4**	169,75	+
HS 200-5**	75,75	-
T2 L2 B-2 (7)**	1,13	-
E1 L1 B-(1)**	0,68	+
E1 L1 B-1 (2)**	3,08	-
E3 L1 B1 (3)**	2,10	+
E3 L1 B-1 (4)**	2,50	+
E1 L1 B-1 (5)**	2,35	-
E1 L1 B-1 (6)**	1,50	+
E1 L1 B-1 (7)**	0,35	+
E3 L1 B-1 (7)**	5,30	+
E3 L1 D-1 (4)**	8,18	+
E3 L2 D-1 (7)**	0,12	-
E3 L1 H-1 (1)**	46,50	+
E3 L1 H-1 (4)**	0,95	+
E3 L1 H-1 (7)**	4,40	-
E2 L1 H-3 (7)**	1,35	+
Controle	xxx	-

* Isolados obtidos de lesões da Mancha Branca da milho. ** Isolados obtidos da superfície epifítica de folhas de milho sem a presença de lesões.

Teste de patogenicidade

Foram selecionados para este experimento os isolados WT2, WT7 e WT11 caracterizados anteriormente como positivos para atividade de nucleação de gelo. Os isolados foram submetidos a teste em casa de vegetação e em câmaras de microumidade no Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina, em plantas de milho do híbrido DAS 657, com 35 DAS. Em ambos os métodos, os sintomas passaram a ser observados no sétimo dia após a inoculação do patógeno nas folhas saudáveis.

Em casa de vegetação, o isolado WT7 demonstrou-se o mais agressivo entre os isolados testados, apresentando a maior média de número de

lesões (Tabela 11). As avaliações feitas no nono dia após a inoculação, permitiram observar lesões anasarcas e lesões com centro necrótico nas folhas inoculadas com este isolado (Figura 9). Para os demais isolados, as lesões em sua maioria se apresentavam como manchas anasarcas. O controle diferiu estatisticamente dos tratamentos, não apresentando manifestação dos sintomas.

Tabela 11 – Análise de variância complementada pelo teste de Tukey através do número de lesões observados no teste de patogenicidade em casa de vegetação e em câmaras de microumididade. (Para as análises estatísticas dados foram transformados em raiz quadrada de $x+0,5$).

Isolados	Casa de vegetação	Câmara de microumididade
	Lesões*	
wt2	2,60 ab	3,00 b
wt7	4,40 a	8,67 a
wt11	3,70 ab	4,33 b
Controle	0 b	0 c
CV%	59,45	10,6

*Média dos números de lesões obtidos através de Inoculações artificiais (Dados originais)



Figura 9 – Inoculação artificial de *Pantoea ananatis* na cultura do milho em casa de vegetação. (A) Controle. (B) Isolado WT2. (C) e (D) Isolado WT7. (E) Isolado WT11.

Para as folhas destacadas e inoculadas em câmaras de microumidade, a expressão dos sintomas foi pronunciada no isolado WT7, o qual também apresentou a maior média do número de lesões (Tabela 11). Os demais isolados também expressaram sintomas. O controle não apresentou lesões (Figura 10).

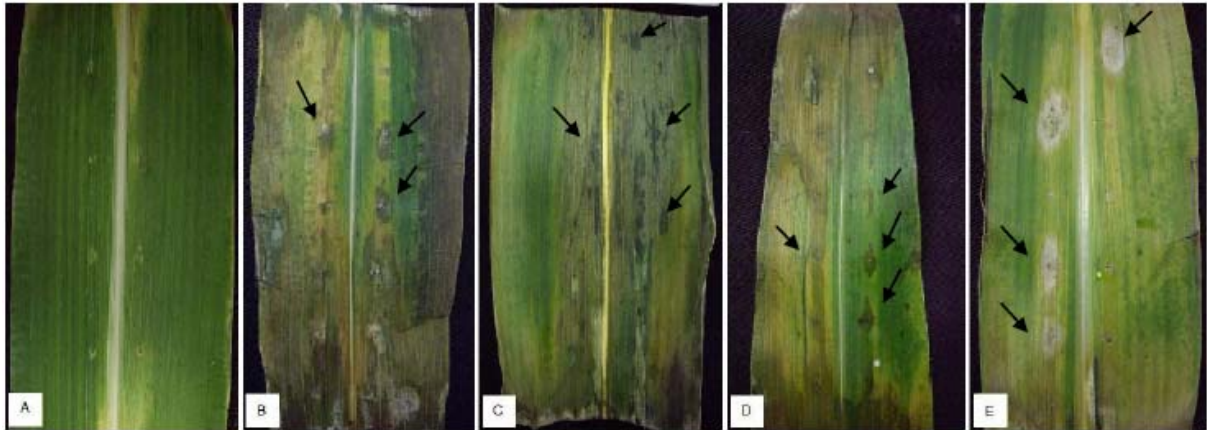


Figura 10 – Inoculação artificial de *Pantoea ananatis* em câmaras de microumidade em folhas de milho com 35 dias após a semeadura. (A) Controle. (B) Isolado WT2. (C) Isolado WT7. (D) e (E) Isolado WT11.

Os resultados obtidos corroboram com Lindow *et al.* (1982), demonstrando a estreita ligação entre atividade de nucleação de gelo e patogenicidade. A presença de populações de bactérias INA+ sobre as folhas de plântulas de milho em uma dada temperatura, é um dos fatores responsável pelos extensos prejuízos causados às plantas durante geadas (LINDOW *et al.*, 1982).

A habilidade de algumas plantas em abrigar grandes populações epifíticas de bactérias INA+ favorece o desencadeamento de sintomas por esta classe de organismos. O aumento da população bacteriana epifítica com atividade de nucleação de gelo ativa, implica no progresso do grau de danos à uma dada temperatura (LINDOW, 1983).

Isolados INA- não foram testados neste trabalho devido os resultados encontrados por Rocha (2009), demonstrarem que isolados INA- de *P. ananatis* extraídos das lesões da Mancha Branca do milho não foram capazes de causar lesão em inoculação à campo e em câmaras de microumidade. Isolados bacterianos INA+ incapazes de ocasionar prejuízos, podem não estar plenamente adaptados para sobrevivência epifítica em folhas de milho (LINDOW *et al.*, 1982).

O estudo sobre o fenótipo INA+ em populações bacterianas tem sido desenvolvido com o objetivo de esclarecer e contribuir para a agricultura na diminuição de danos causados por microrganismos com este fenótipo, já que ele desempenha um importante papel na virulência das bactérias (EDWARD *et al.*, 1994).

CONCLUSÕES

As bactérias epifíticas da espécie *P. ananatis* encontram-se distribuídas de forma desuniforme sobre a superfície foliar. A caracterização dos isolados epifíticos demonstrou que estes são semelhantes aos isolados obtidos diretamente das lesões da Mancha Branca do Milho. Essa caracterização demonstrou que essa espécie habita epifiticamente a superfície foliar e que por algum mecanismo ainda desconhecido, passa desse estágio epifítico para o patogênico.

Os Isolados epifíticos de *P. ananatis* apresentaram atividade de nucleação de gelo, de forma semelhante aos isolados obtidos diretamente da lesão. Os Isolados INA+ obtidos da lesões da Mancha Branca do Milho, apresentaram vesículas na superfície celular, semelhantes aquelas descritas por outros autores como vesículas responsáveis pela liberação de núcleos de gelo. O número de vesículas aumentou quando os isolados foram cultivados em presença de glicerol, um indutor da atividade de nucleação de gelo.

Os isolados INA+ de *P. ananatis* foram capazes de infectar plantastanto em casa de vegetação como em folhas destacadas acondicionadas em câmaras de microumidade sob condições controladas.

REFERÊNCIAS

- BOUZAR, H.; JONES, J. B.; HODGE, N. C. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 733-739, 1993.
- EDWARDS, A. R.; VAN den BUSSCHET, WICHMAN, H. A.; ORSER, C. S. Unusual Pattern of Bacterial Ice Nucleation Gene Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 11, p. 911-920, 1994.
- ESCANFERLA, M. E. **Avaliação das condições de crescimento e fatores que propiciam a disseminação da bactéria *P. ananás* no ambiente**. 2005. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- 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. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26, 2006; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 2; SIMPÓSIO SOBRE *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA*, 1, 2006. Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte, 2006. CD-ROM.
- FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Principais doenças na cultura do milho. **Circular técnica Embrapa**, Sete Lagoas, v. 2, p. 80, 2000.
- GURIAN-SHERMAN, D.; LINDOW, S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 7, p. 1338-1343, 1993.
- HIRANO, S. S., UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 624-653, 2000.
- HIRANO, S. S.; BAKER, L. S.; UPPER, C. D. Ice nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleation active bacteria and frost injury. **Plant Physiology**, Washington, v. 77, p. 259-265, 1985.
- JONES, J. B.; Chase, A. R.; Harris G. K. Evaluation of Biolog GN MicroPlate system for identification of some plant pathogenic bacteria. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 553-558, 1993.

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

LINDEMANN, J.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* on snap bean and nonhost plants and the incidence of bacterial brown spot disease in relation to cropping patterns. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, p. 1329-1333, 1984.

LINDOW, S.E. Competitive Exclusion of Epiphytic Bacteria by Ice-*Pseudomonas syringae* Mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 2520-2527, 1987.

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

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

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

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

MARRIEL, I. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R.; BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Perfil Metabólico de Bactérias Isoladas de Lesões de Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* em Milho, Através do Sistema Biolog. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25, 2004; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 1, 2004, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, 2004.

MASON, B. J.; HALLETT, J. Ice-forming nuclei. **Nature**, London, v. 79, p. 357-359, 1957.

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

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

MICHIGAMI, Y.; ABE, K.; IWABUCHI, K.; OBATA, H.; ARAI, O. Formation of ice nucleation-active vesicles in *Erwinia uredovora* at low temperature and transport of InaU molecules into shed vesicles. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokio, v. 10, p. 1996-1998, 1995.

MONIER, J. M.; LINDOW, S. E. Frequency, Size, and Localization of Bacterial Aggregates on Bean Leaf Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 346-355, 2004.

MOROHOSHI, T.; NAKAMURA, Y.; YAMAZAKI, G.; SHIDA, 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**, Washington, v. 189, p. 8333-8338, 2007.

MORRIS, C. E.; MONIER, J. M.; JACQUES, M. A. A Technique To Quantify the Population Size and Composition of the Biofilm Component in Communities of Bacteria in the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4789-4795, 1998.

O'BRIEN, R. D.; LINDOW, S. E. Effect of plants species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 619-627, 1989.

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 Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 275-279, 2001.

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**, Washington, v. 91, p. 197- 201, 1994.

PHELPS, P.; GIDDINGS, T. H.; PROCHODA, M.; FALL, R. Release of cell-free ice nuclei by *Erwinia herbicola*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 167, p. 496-502, 1986.

POMINI, A. M.; ARAUJO, W. L.; MARSAIOLI, A. J. Structural elucidation and biological activity of acyl-homoserine lactones from the phytopathogen *Pantoea ananatis* Serrano 1928. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 1769-1778, 2006a.

POMINI, A. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MARSAIOLI, A. J. Estudo químico das substâncias sinalizadoras produzidas pela bactéria *Pantoea agglomerans*, isolada da doença da pinta branca do milho. In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 29, 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2006b. CD ROM.

ROCHA, K. R. **Perfil genético de *Pantoea ananatis* agente causal da doença Mancha Branca do Milho e fatores envolvidos no desenvolvimento da doença.** 2009. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas.** Viçosa: UFV, 2001.

ROUSE, D. I.; NORDHEIM, E. V.; HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. A model relating the probability of foliar disease incidence to the population frequencies of bacterial plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 505-509, 1985.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 35-50, 2004.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **Biologia Plantarum**, Praha, v.4, n. 44, p. 546, dec. 2001.

WYSMIERSKI, P. T.; ESCANFERLA, M. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Atividade de nucleação de gelo e produção de exoenzimas em *Pantoea ananatis*, agente causal da Pinta Branca do Milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. S57-S57, 2005.

WYSMIERSKI, P. T.; REAL, K.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *Pantoea ananatis*: Monitoramento da população epifítica sobre folhas de milho e avaliação de métodos artificiais de inoculação. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26, 2006; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 2; SIMPÓSIO SOBRE *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA*, 1. Belo Horizonte, 2006. **Anais....** Belo Horizonte, 2006. p. 1-5.

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**, Amsterdam, v. 258, p. 297-300, 1989.

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**, Saint Paul, v. 8, p. 44-49, 2005.

AMARAL, A. L.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F.; DAL SOGLIO, F. K. *Phoma sorghina*, a new pathogen associated with phaeosphaeria leaf spot on maize in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, p. 259, 2004.

ARAI, S.; WATANABE, M. Freeze texturing of food materials by ice-nucleation with the bacterium *Erwinia ananas*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v. 50, p. 169-175, 1986.

AZAD, H. R.; HOLMES, G. J.; COOKSEY, D. A. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* e *Pantoea stewartii*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 973-979, 2000.

BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. The Secret Life of Foliar Bacterial Pathogens on Leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 145-172, 1995.

BLAKEMAN, J. . Pathogens in the foliar environment. **Plant Pathology**, Oxford, v. 42, p. 479-493, 1993.

BLOCK, C. C.; HILL, J. H.; MCGEE, D. C. Seed transmission of *Pantoea stewartii* in field and sweet corn. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 775-780, 1998.

BODMAN, S. B. V.; FARRAND, S. K. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, p. 5000-5008, 1995.

BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A., MASSOLA JR, 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**, Brasília, v. 33, p. 1-6, 2008.

CARSON, M. L. Vulnerability of U.S. maize germplasm to *Phaeosphaeria* leaf spot . **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, p. 462-464, 1999.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. Doenças foliares. In: EMBRAPA MILHO E SORGO. **Cultivo do milho**. 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/dfoliare.htm>> Acesso em: 16 out. 2009.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. The *phaeosphaeria* leaf spot of maize in Brazil: evidences of a new etiological agent?. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 335-336, 2006.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA DE MILHO. **Rendimento agrícola dos principais países produtores de milho (kg/ha)**. 15 de agosto de 2009. Disponível em: <<http://cimilho.cnpms.embrapa.br/estatisticas/estatisticas.php?tabela=005>>. Acesso em: 09 mar. 2010.

CERVELATTI, E. P.; PAIVA, E. MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; FERNADES, F. T.; TEIXEIRA, F. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions os *phaeosphaeria* leaf spot in maize. **Revista brasileira de milho e sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, p. 30-37, 2002.

CHA, J. S; PUJOL, C.; DUCUSIN, A. R.; ACION, E. A.; HUBBARD, C. H.; KADO, C. I. Studies on *Pantoea citrea*, the Causal Agent of Pink Disease of Pineapple. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, p. 313-319, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: nono levantamento**. Levantamento junho de 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/9graos_08.09.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2009.

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

DUARTE, O. J. **Importância econômica.** In: EMBRAPA MILHO E SORGO. **Cultivo do milho:** sistema de produção. 2000. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm#topo>>. Acesso em: 13 nov. 2009.

EDENS, D. G.; GITAITIS, R. D.; SANDERS, F. H.; NISCHWITZ, C. First Report of *Pantoea agglomerans* Causing a Leaf Blight and Bulb Rot of Onions in Georgia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 1551, 2006.

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

ESCANFERLA, M. E. **Avaliação das condições de crescimento e fatores que propiciam a disseminação da bactéria *P. ananás* no ambiente.** 2005. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26, 2006; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 2; SIMPÓSIO SOBRE *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA*, 1, 2006. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2006. CD-ROM.

ESKER, P. D.; NUTTER JR., F. W. Temporal dynamics of corn flea beetle populations infested with *Pantoea stewartii*, causal agent of Stewart's disease of corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 210-218, 2003.

FANTIN, G. M. Mancha de *Phaeosphaeria*, doença do milho que vem aumentando sua importância. 1994. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/Phaeosphaeria/Index.htm>. Acesso em: 13 nov. 2009.

FERNANDES, F. T. Doenças de plantas: milho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, p. 83-87, 1985.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Principais doenças na cultura do milho. **Circular técnica Embrapa**, Londrina, v. 2, p. 80, 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, 20, 1995, Brasília. **Anais...**Brasília, 1995. p. 309.

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

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

GLAT, D.A. Cultura do milho na China. **Informativo Pioneer**, Santa Cruz do Sul, n. 29, 2009. p. 20.

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

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

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Milho e soja fazem Brasil ter produção recorde de grãos em 2007**. 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1190&id_pagina=1>. Acesso em: 17 jul. 2009.

JACQUES, M. A.; KINKEL, L. L.; MORRIS, C. E. Population Sizes, Immigration, and Growth of Epiphytic Bacteria on Leaves of Different Ages and Positions of Field-Grown Endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 899-906, 1995.

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

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 Genetic Plant Pathology**, v. 74, p. 302-312, 2008.

KINKEL, L. L.; WILSON, M.; LINDOW, S. E. Plant Species and Plant Incubation Conditions Influence Variability in Epiphytic Bacterial Population Size. **Microbial Ecology**, New York, v. 39, p. 1-11, 2000.

LANZA, F. E.; COSTA, R. V. da; COTA, L. V.; CASELA, C. R.; SILVA, D. D.; PEREIRA, I. S. Avaliação de fungicida doses e número de aplicações para o manejo da antracnose do sorgo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, Supl., v. 34, p. S93, ago. 2009.

LINDEMANN, J.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* on snpa bean and nonhost plantas and the incidence of bacterial brown spot disease in relation to cropping patterns. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, p.1329-1333, 1984.

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

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

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

MARRIEL, I. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. ; BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Perfil Metabólico de Bactérias Isoladas de Lesões de Mancha Foliar de Phaeosphaeria em Milho, Através do Sistema Biolog. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25, 2004; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 1, 2004, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, 2004.

MASON, B. J.; HALLETT, J. Ice-forming nuclei. **Nature**, London, v. 79, p. 357-359. 1957.

MENELAS, B.; BLOCK, C. C.; ESKER, P. D.; NUTTER JR, F. W. Quantifying the feeding periods required by corn flea beetles to acquire and transmit *Pantoea stewartii*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 319- 324, 2006.

MERCIER, J.; LINDOW, S. E. Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington ,v. 66, p. 369-374, 2000.

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

MIKLASEVICIUS, J.;FREITAS JR, G. Área de milho deve ficar estável. **O Estado de S.Paulo**, São Paulo, 13 maio 2009. Caderno Agrícola, p. 3. Disponível em: <<http://www.abramilho.org.br/noticias.php?cod=447>>. Acesso em: 17 jun. 2009.

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

MONIER, J. M.; LINDOW; S. E. Frequency, Size, and Localization of Bacterial Aggregates on Bean Leaf Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 346-355, 2004.

MORALES-VALENZUELA, G.; SILVA-ROJAS, H. V.; OCHOA-MARTÍNEZ, D.; VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; ALARCÓN-ZÚÑIGA, B.;ZELAYA-MOLINA, L.X.;CÓRDOVA-TÉLLEZ, L.; MENDOZA-ONOFRE, L.; VAQUERA-HUERTA, H.; CARBALLO-CARBALLO, A.; FARFÁN-GÓMEZ, A.;ÁVILA-QUEZADA, G. First Report of *Pantoea agglomerans* Causing Leaf Blight and Vascular Wilt in Maize and Sorghum in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 1365, 2007.

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**, Washington, v. 189, p. 8333-8338, 2007.

O'BRIEN, R. D.; LINDOW, S. E. Effect of plants species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 619-627, 1989.

OKADA, K.; TAKEUCHI, Y.; WATANABE, M.; ARAI, S. N. Alkylphenyldimethylammonium salts as inhibitors of the ice nucleating activity of *Erwinia ananas*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio, v. 54, p. 549-550, 1990.

OLIVEIRA, C. G. **Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e Quorum sensing em *Chromobacterium violaceum***. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, E.; FERNANDES, F. T.; CARVALHO, E. M.; MACHADO, J. C. The phaeosphaeria leaf spot of maize in Brazil: evidences of a new ethiological (sic!) agent. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, p. 343-356, 2004.

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. CDROM.

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 Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 275-279, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MEIRELLES W. F.; PARENTONI, S. N.; MARRIEL, I.E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Reaction of maize inbred lines to a bacterium, *Pantoea ananas*, isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, p. 587-590, 2002.

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**, Washington, v. 91, p. 197- 201, 1994.

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

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

PHELPS, P.; GIDDINGS, T. H.; PROCHODA, M.; FALL, R. Release of cell-free ice nuclei by *Erwinia herbicola*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 167, p. 496-502, 1986.

POMINI, A. M.; ARAUJO, W. L.; MARSAIOLI, A. J. Structural elucidation and biological activity of acyl-homoserine lactones from the phytopathogen *Pantoea ananatis* Serrano 1928. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 1769-1778, 2006a.

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 Food Chemical**, Oxford, v. 55, p. 1200 -1204, 2007.

_____. Estudo químico das substâncias sinalizadoras produzidas pela bactéria *Pantoea agglomerans*, isolada da doença da pinta branca do milho. In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 29, 2006b, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2006b. CD ROM.

PUJOL, C. J.; KADO, C. I. Genetic and Biochemical Characterization of the Pathway in *Pantoea citrea* Leading to Pink Disease of Pineapple. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 2230-2237, 2000.

RAMSTEDT, M.; ASTRÖM, B.; VON FIRCKS, A. H. Dieback of poplar and willow caused by *Pseudomonas syringae* in combination with freezing stress. **Europ. Journal Forest Pathology**, Hamburg, v. 24, p. 305-315. 1994.

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

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 35-50, 2004.

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

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

SILVA, R. J. V. A.; CABRAL, J. S. R.; SOUSA, D. S.; LIMA, R. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; CASELA, C. R.; MEIRELLES, W. F.; PEREIRA, F. C. Aplicação "in vitro" de bactericidas e fungicidas no controle da mancha branca do milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 319-320, 2007.

SOLOGUREN, L. **Produtividade do milho no Brasil: o novo desafio para consolidar as exportações**. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/pdf/sologuren.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2009.

STROMBERG, K. D.; KINKEL, L. L.; LEONARD, K. J. Relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p.131-135, 1999.

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

TURNER, M. A.; ARELLANO, F.; KOZLOFF, L. M. Components of ice nucleation structures of bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 6515-6527, 1991.

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

WANG, K.; KAN, L.; ANAND, A.; LAZAROVITS, G.; MYSORE, K. S. Monitoring in planta bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv. **New Phytologist**, London, v. 174, p. 212-223, 2007.

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

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

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J. L.; SALMOND, G.P.C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 25, p. 365-404, 2001.

WILSON, M.; HIRANO, S. S.; LINDOW, S. E. Location and Survival of Leaf-Associated Bacteria in Relation to Pathogenicity and Potential for Growth within the Leaf. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1435-1443, 1999.

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

WYSMIERSKI, P. T.; REAL, K.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *Pantoea ananatis*: Monitoramento da população epifítica sobre folhas de milho e avaliação de métodos artificiais de inoculação. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26, 2006; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 2; SIMPÓSIO SOBRE *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA*, 1. Belo Horizonte, 2006. **Anais....** Belo Horizonte, 2006. p. 1-5.

ZASYPKIN, D. V.; LEE, T. C. Extracellular ice nucleators from *Pantoea ananas*: effects on freezing of model foods. **Journal Food Science**, Champaign, v. 64, p. 473-478, 1999.

ANEXOS

ANEXO A – Dados Meteorológicos

Tabela 12 – Dados meteorológicos do período correspondente às coletas das folhas dos três diferentes híbridos realizadas na safra verão 2008/2009 na Embrapa Soja-Londrina/Pr. ^a Primeira coleta. ^b Segunda coleta. ^c Terceira coleta. ^d Quarta coleta. ^e Quinta coleta.

Dados meteorológicos – Safra verão 2008/2009											
Janeiro/2009	Temperatura			UR* (%)	Precipitação Acumulada (24h)	Fevereiro/2009	Temperatura			UR* (%)	Precipitação Acumulada (24h)
Dia	Média	Máxima	Mínima			Dia	Média	Máxima	Mínima		
1	22,8	28,3	19,9	103,3	5,3	1	24,47	29,89	19,35	97,7	0
2	21,5	25,4	19,8	109,8	23,8	2	24,04	27,94	20,32	101,7	0
3	21,7	25,2	19,0	106,0	5,9	3	21,89	26,09	19,66	108,1	0
4	19,6	25,1	16,5	102,5	0,4	4^d		29		57,3	0
5	18,0	23,6	15,3	106,3	15,0	5	24,87	30,42	19,57	71,9	0
6	21,0	27,8	15,3	91,8	0,0	6	23,9	30,98	19,55	76,6	3,9
7	23,1	29,8	16,3	85,9	0,0	7	23,56	29,04	20,28	79,6	0,1
8	25,1	31,1	18,4	77,6	0,0	8	24,31	29,51	20,33	79,2	0
9	26,2	32,1	19,5	68,9	0,0	9	25,31	30,4	20,69	75,8	18,1
10	24,9	30,8	19,3	91,7	0,2	10	24,16	28,69	20,69	81,4	0,6
11	21,1	23,5	18,8	108,7	6,7	11^e	23,54	28,98	21,3	87,6	13,4
12	24,5	30,8	18,3	96,9	1,6	12	23,84	29,36	19,94	77,6	0
13^a	26,2	31,6	21,9	92,2	0,0	13	21,44	25,77	17,86	73,8	0
14	23,6	30,9	19,3	99,6	0,0	14	21,14	27,17	15,75	74,9	0
15	22,9	26,8	20,1	104,9	0,0	15	21,51	27,22	17,23	77,5	0
16	22,1	26,3	20,5	107,7	0,0	16	21,21	23,45	20,36	92,2	40
17	19,7	21,0	18,6	110,4	0,0	17	22,47	28,1	19,89	83,5	3,5
18	21,5	24,1	19,6	109,2	0,0	18	25,71	31,33	20,18	67,02	0
19	21,9	25,9	19,9	109,2	0,0	19	25,73	30,78	20,62	68,42	0
20	23,1	28,3	19,8	102,7	0,0	20	25,44	31,78	20,39	69,04	0
21^b	20,9	23,9	18,8	103,9	0,0	21	26,47	31,97	21,94	63,93	0
22	21,6	26,0	18,3	98,9	0,0	22	26,91	32,98	21,31	60,96	0
23	21,3	27,1	16,0	94,0	0,0	23	25,55	32,88	21,61	67,75	0
24	22,0	27,8	16,0	96,7	0,0	24	24,23	30,39	18,26	74	70,6
25	23,0	28,7	19,7	102,6	0,0	25	21,87	26,79	18,43	85	18,5
26	21,1	22,4	20,3	110,2	0,0	26	22,7	28,34	19,59	81,6	0
27	21,5	24,7	19,9	109,6	0,0	27	23,14	27,88	20,67	85	10,5
28^c	22,0	26,0	20,1	108,9	0,0	28	24,73	30,29	20,54	74,9	1,9
29	22,2	26,7	20,7	108,3	0,0						
30	23,5	28,3	20,5	105,3	0,0						
31	23,3	29,4	20,7	104,7	0,0						

Tabela 13 – Dados meteorológicos do período correspondente às coletas das folhas dos três diferentes híbridos realizadas na safrinha/2009 na Embrapa Soja- Londrina/Pr. ^a Primeira coleta. ^b Segunda coleta. ^c Terceira coleta. ^d Quarta coleta.

Dados meteorológicos – Safrinha/2009									
Agosto/2009	Temperaturas		UR* (%)	Precipitação Acumulada (24h)	Setembro/2009	Temperaturas		UR* (%)	Precipitação Acumulada (24h)
Dia	Máxima	Mínima			Dia	Máxima	Mínima		
1	22,3	13,5	71,3	0,0	1	30,1	19,0	44,0	0,0
2	19,3	15,7	89,5	5,9	2	31,5	20,0	47,8	0,0
3	22,7	13,2	57,2	0,1	3	24,1	19,0	68,8	3,2
4	25,2	14,0	60,0	0,0	4	22,1	18,0	86,3	22,7
5	24,9	14,8	70,8	0,0	5	26,0	18,0	69,5	0,1
6	29,7	18,1	47,0	0,0	6	20,0	15,3	84,8	38,0
7	27,1	17,8	63,0	0,0	7 ^c	29,3	15,7	74,8	19,8
8	29,2	18,3	45,3	0,0	8	30,0	19,6	69,8	0,2
9	27,9	14,4	73,5	0,0	9	23,6	17,2	83,0	23,6
10 ^a	15,0	8,6	73,8	0,0	10	24,2	18,1	79,3	0,1
11	20,5	8,7	70,0	0,0	11	26,0	16,5	70,3	0,0
12	22,8	9,1	58,8	0,0	12	28,6	15,9	69,5	0,0
13	26,2	11,5	60,8	0,0	13	27,9	18,0	58,5	0,0
14	27,3	15,5	38,0	0,0	14	28,7	18,0	71,0	0,0
15	27,7	12,8	34,5	0,0	15	27,8	15,0	66,0	0,0
16	28,4	15,7	45,0	0,0	16	27,3	16,3	56,5	0,0
17	21,5	16,3	83,8	12,7	17	28,3	17,5	53,5	0,0
18	17,7	15,4	90,5	43,4	18	28,7	14,7	73,8	16,2
19	18,5	16,0	89,3	27,1	19	23,2	18,0	87,3	17,3
20	18,8	12,6	87,0	19,9	20	26,8	15,3	52,3	0,0
21	20,6	9,5	39,5	0,0	21 ^d	20,9	16,6	90,6	12,3
22	19,6	8,1	61,5	0,0	22	23,1	16,7	91,2	0,9
23	14,9	10,7	89,0	6,5	23	23,3	15,9	84,7	24,1
24 ^b	19,5	12,7	84,8	0,0	24	25,2	12,1	59,4	0,0
25	23,8	14,1	73,0	0,0	25	23,8	11,5	70,4	0,0
26	24,3	12,3	69,0	0,0	26	28,6	13,2	62,2	0,0
27	26,1	13,4	56,5	0,0	27	33,0	19,3	62,0	12,2
28	26,5	14,0	47,5	0,0	28	30,1	17,6	70,3	0,7
29	27,9	14,0	48,8	0,0	29	24,8	15,4	77,4	0,0
30	28,9	15,0	49,3	0,0	30	21,6	13,1	73,2	0,0
31	29,3	15,0	38,5	0,0					