

**Perfil Metabólico de Bactérias Isoladas de Lesões de Mancha  
Foliar de  
Phaeosphaeria em Milho, Através do Sistema Biolog**

[Previous](#) [Top](#)  
[Next](#)



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C

IVANILDO E. MARRIEL<sup>1</sup>, ALEXANDRE S. FERREIRA<sup>1</sup>, CARLOS R. CASELA<sup>1</sup>,  
MIRIAM K. UTIDA<sup>2</sup>, GISELLE G. MONTEIRO<sup>3</sup>, ANDRÉA A. CARNEIRO<sup>1</sup>,  
CLEIDE A. BOMFETI<sup>2</sup>, EDNÉIA A. SOUZA-PACCOLA<sup>2</sup> e LUZIA D. PACCOLA-  
MEIRELLES<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil; <sup>2</sup>UFMG/ ICB, Departamento de Botânica, 31270-901-Belo Horizonte-MG, Brasil; <sup>3</sup>Izabela Hendrix, Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR .E-mail:

[imarriel@cnpms.embrapa.br](mailto:imarriel@cnpms.embrapa.br)

## **INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, observou-se uma mudança acentuada na agricultura brasileira em termos de sistema de plantio, de manejo e de intensidade de cultivo. Essas alterações podem refletir na incidência de doenças que afetam a produtividade das culturas. Na cultura do milho, freqüentemente, tem sido verificada a ocorrência de uma doença foliar que apresenta, no seu estágio inicial, lesões cloróticas, tipo anasarca, tornando-se necróticas mais tarde. Esta doença foi descrita inicialmente como causada pelo fungo *Phaeosphaeria maydis*, f. imperf. *Phyllosticta* sp. (Rane *et al.*, 1966; Fantim, 1994). Entretanto, em função das características iniciais do sintoma dessa doença e das dificuldades de se isolar fungos a partir de lesões anasarcas (Cervelatti *et al.*, 2000; Paccola-Meirelles *et al.*, 1999), o papel de um fungo como agente etiológico da doença tem sido questionado. Em 2001, Paccola-Meirelles e colaboradores isolaram uma bactéria gram negativa de coloração amarela brilhante, identificada como *Pantoea ananas* (syn *Erwinia herbicola*), a partir de lesões jovens e evidenciaram seu papel como agente inicial das lesões em plantas de milho sob condições controladas.

Dentre as diferentes técnicas disponíveis para a caracterização fenotípica de microrganismos, atualmente, o sistema Biolog tem sido utilizado para diagnose de bactérias fitopatogênicas gram negativas (Jones *et al.*, 1993), baseado na reação de uma série de 95 fontes de carbono. O desenvolvimento de cor resulta da oxidação dessas fontes de carbono distribuídas na placa, constituindo um padrão de utilização de substrato chamado de perfil metabólico específico. Neste trabalho, comparou-se o perfil metabólico de bactérias predominantes em lesões anasarcas de genótipos de milho, em relação ao de outras bactérias.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, testaram-se 10 isolados de bactérias. Oito obtidos em trabalho de quantificação de populações bacterianas em lesões anasarcas (seis isolados), lesões necróticas (um isolado) e em folha assintomática (um isolado), a partir de cinco genótipos de milho (Marriel et al., 2004). Os dois isolados restantes foram obtidos de amostras de solo. O perfil metabólico dessas bactérias foi determinado através do método preconizado por Zak et al. (1994), utilizando-se microplacas GN2® (Biolog, Inc. HAYWARD; A; USA). Cada microplaca contendo 95 fontes de carbono. As culturas bacterianas, cultivadas em caldo de soja triplicaseína (TSB), durante 48 horas sob agitação, foram centrifugadas e ressuspendidas em solução salina, 0,85%, ajustando-se essa suspensão para uma concentração final de 0,8 DO. Um alíquota 120 microlitros de cada suspensão diluída foi transferida para cada cavidade das microplacas. Após a incubação de 24 horas, efetuou-se a leitura de absorbância das reações, em um leitor de placa elisa (Labstems, Multiskan, MS), a 405 nm. As variáveis da diversidade metabólica estimadas e analisadas foram: índice de diversidade de Shannon (H), riqueza de substrato (S), equidade (E), e a atividade total (AT), soma da absorbância de todos substratos. Os resultados foram comparados através de análises de variância (MSTAT-C), de cluster e de componentes principais (programa STATISTICA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados apresentados foram obtidos após um período de incubação das microplacas GN2 de 24 horas. As leituras efetuadas após 16 horas de incubação não permitiram a análise para algumas das estirpes testadas, em particular, as bactérias isoladas de folhas de milho assintomáticas, sem lesões, e os isolados de amostras de solo, usadas como referências. Dos dez isolados de bactérias testados, cinco apresentavam coloração amarelada brilhante e predominância absoluta nas lesões anasarcas, independente dos

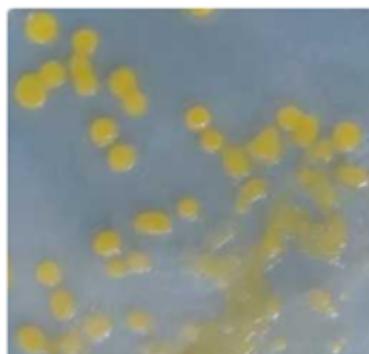


Figura 1. Aspecto morfológico de colônias da bactéria predominante em lesões anasarcas de folha de milho

genótipos. Embora ainda não identificadas, esses isolados apresentam características similares às da bactéria isolada por Paccola-Meirelles *et al.*, 2001, e identificada como *Pantoea ananas*.

As análises de variância mostraram diferenças significativas entre os isolados para índice de diversidade metabólica (H), diversidade de substrato (S), equidade ou índice de similaridade (E) e atividade total. Independente desses parâmetros analisados, observou-se que os cinco isolados de bactérias amarelas (Iso 1, 2, 3, 4 e 5), predominante nas lesões anasarcas e o isolado 8, de cor branca, não diferiram entre si e apresentaram valores mais elevados para a diversidade de substratos (Figura 2), bem como para as demais variáveis

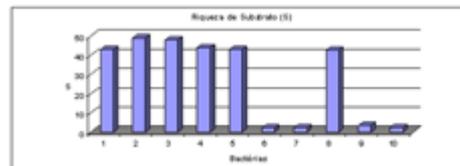


Figura 2. Diversidade de substratos utilizados para 10 isolados de bactérias obtidas a partir de lesões de anasarca e de solo.

estudadas, em relação aos outros isolados. Observa-se elevada capacidade metabólica, com o número de substratos utilizados por essas bactérias variando de 42 a 49 fontes de carbono das 95 contidas nas placas GN2. Variabilidade intra-específica e interespecífica para diversidade funcional em populações de fitopatógenos são freqüentes (Jones *et al.*, 1993)

Os resultados demonstram também que as estimativas de H, S, E e AT não fornecem necessariamente informações sobre quais tipos de substratos foram utilizados pelas bactérias e devem ser analisados com cautela. Os valores próximos de 4 observados para H, para os isolados 1, 2, 3, 4, 5 e 8, poderiam induzir a erros de interpretação, em termos de diversidade microbiana. Neste caso, os valores são explicados pela elevada capacidade metabólica dessas bactérias. Entretanto, a análise de *cluster*, baseado na presença e ausência de substratos utilizados, via



Figura 4. Dendrograma de similaridade entre isolados de bactérias obtidas de lesões anasarcas em folhas de milho.

Índice de similaridade, detectam tais diferenças entre populações (Zack *et al.*, 1994). Assim o relacionamento entre bactérias, via dendrograma de similaridade (Figura 3), mostrou dois grupos principais: I) o grupo I incluiu os cinco isolados de bactérias amarelas, II) o grupo II incluiu o isolado 8 e, III) o grupo III incluiu os demais isolados. Nota-se alto grau de relacionamento

entre as bactérias amarelas predominantes em lesões anasarcas e, em menor extensão com o isolado 8, independente dos genótipos avaliados. Estudos para a identificação dessas bactérias via sequenciamento e afiliação taxonômica estão em andamento.

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que: (i) as bactérias amarelas, predominantemente isoladas a partir de lesões do tipo anasarca, apresentam elevada diversidade metabólica; (ii) essas bactérias demonstram alta similaridade entre si, com relação ao perfil metabólico, independente da planta hospedeira (iii) apresentam perfil metabólico distinto do de outras bactérias isoladas das mesmas lesões, bem como de bactérias isoladas de amostras de solo.

## LITERATURA CITADA

- GARLAND J. L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source-utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:2351-2359. 1991.
- JONES J. B.; CHASE, A.R.; HARRIS, G.K. Evaluation of the biolog GN microplate system for identification of some plant-pathogen bacteria. 77(6): 553-558. 1993
- MARRIEL, I.E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C.R., OLIVEIRA, A.C.; UTIDA, M.K.; MONTEIRO, G.G.; BOMFETI, C.A.; SOUZA-PACCOLA, E.A.; MEIRELLES, W.F.; LUZIA D. PACCOLA-MEIRELLES. Análise quantitativa e metabólica da população bacteriana em lesões de mancha foliar de *Phaeosphaeria* em milho. 2004
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S., MARRIEL, I.E.; MEIRELLES, W.F. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, p.314-315, 1999.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D., FERREIRA, A.S.; MEIRELLES, W.F.; MARRIEL, I.E.; CASELA, C.R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. *Journal of Phytopathology*, v. 149 p. 275-279, 2001.
- RANE MS, PAYAK MM, RENFRO BL. A *Phaeosphaeria* leaf spot of maize In: *Proceedings of the Symposia on Diseases of Rice Maize Sorghum and Millets 1966* New Delhi India: The Indian Phytopathological Society 8-10, 1966.
- ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1101-1108, 1994.

