

## **Crescimento, viabilidade e disseminação da bactéria *Pantoea ananatis*, agente causal da doença Mancha Branca do Milho**

Maria Eugênia Escanferla<sup>1</sup>, Philip T. Wysmierski<sup>1</sup>, Walter F. Meirelles<sup>2</sup> e Luzia D. Paccola-Meirelles<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, C.P. 6001, 86051-990, Londrina, PR. E-mail: [paccola@uel.br](mailto:paccola@uel.br). <sup>2</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG

Palavras-chave: *Erwinia ananatis*, pinta branca, mancha de *Phaeosphaeria*.

A doença pinta branca ou mancha branca do milho instalou-se no Brasil na década de 80 e a partir dos anos 90 sua incidência e severidade aumentaram significativamente, podendo hoje ser encontrada em praticamente todas as regiões onde o milho é cultivado (Fernandes e Oliveira, 1997).

Paccola-Meirelles *et al.* (2001) isolaram uma bactéria de coloração amarela a partir de lesões em estágio inicial da doença. Esta bactéria foi identificada como pertencente à espécie *Pantoea ananatis* Serrano (syn. *Erwinia ananas*) e, quando reinfetada em plantas de milho, sob condições controladas, reproduziu sintomas semelhantes ao do campo.

Foi descrito recentemente que a espécie *P. ananatis* apresenta a capacidade de produzir o fenômeno de “ice nucleation” ou nucleação de gelo (INA). Quando tal fato ocorre, o sistema de membranas da célula vegetal entra em colapso e ocorre a mancha encharcada ou anasarca sucedida por morte dos tecidos por congelamento, o que poderia em parte explicar o desenvolvimento da doença na cultura do milho.

Considerando esta característica em *P. ananatis*, e considerando o desconhecimento dos fatores envolvidos na patogenicidade da bactéria, este trabalho objetivou avaliar as condições de crescimento e os fatores que contribuem para com a patogenicidade da bactéria.

### **Material e Métodos**

**Isolamento da bactéria *P. ananatis* a partir de lesões anasarcas da mancha branca do milho:** A bactéria *P. ananatis* foi isolada a partir de lesões jovens da doença obtidas a campo. Folhas de milho contendo lesões do tipo anasarca foram coletadas, lavadas com sabão neutro, retiradas das folhas, desinfetadas com álcool 70% por 1 min, com cloramina T 0,25% por 4 min e lavadas três vezes em água destilada esterilizada por 1 min (cada lavagem). A água da última lavagem foi plaqueada em meio NA (Nutriente Agar) para controle da metodologia de desinfecção. Com auxílio de um bisturi esterilizado as bordas de cada lesão foram retiradas (aproximadamente 1mm) e então cada segmento transferido para meio NA acrescido de ciclohexamida (50 µg/mL de meio). As placas foram incubadas em estufa 30°C ± 2°C. Foram selecionadas e isoladas as bactérias que apresentavam morfologia semelhante a *P. ananatis*. Todos os isolados foram testados quanto a capacidade de nucleação no gelo.

**Crescimento de *P. ananatis* em laboratório:** Para avaliar o crescimento bacteriano foi selecionado o isolado E2, patogênico a plantas de milho (testes realizados por outros autores) e mostrou-se eficiente na nucleação de gelo. O isolado foi cultivado em meio NB (Nutrient Broth) durante 24 h a 30 ± 2°C. Após este período, alíquotas de 100µl da cultura foram adicionadas aos diferentes meios líquidos: Nutrient Broth (NB); Tripitic Soy Broth (TSB);

Meio Seletivo para *Erwinia* (MSE) ; Meio Seletivo para *Erwinia* de Kado e Heskett, 1970; meio 523 de Kado e Heskett, 1970 e meio DYGS (Rodrigues-Neto *et al.*, 1986. O material foi incubado a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  e seu crescimento avaliado em espectrofotômetro, através de turbidimetria, com comprimento de onda de 700nm a cada 2 h, totalizando seis avaliações. Para o controle, foram adicionados aos meios testes, 100µl de meio NB sem a bactéria. Foi utilizado o Teste de Tukey a 5% de significância, para análise de comparação de médias.

**Determinação da viabilidade *P. ananatis* em diferentes condições ambientais:** Foi avaliada a viabilidade da bactéria, utilizando o isolado E2, em dois sistemas: I) O isolado E2 foi cultivado em meio NB. Alíquotas de 100µl da cultura foram transferidas para tubos contendo 5 ml de meio NB. Os tubos foram incubados a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 hrs. Após este período, as culturas foram mantidas a  $12^\circ\text{C}$  e  $-6^\circ\text{C}$  e mensalmente alíquotas de 100µl de cada cultura foram transferida para meio NA para análise da viabilidade das células. Foram realizadas três repetições para cada temperatura. II) Tubos contendo meio NA inclinado foram inoculados com o isolado E2 e incubados à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 hrs. Após este período as culturas foram cobertas com óleo mineral e mensalmente reinoculadas em meio NA a fim de verificar a viabilidade das células. Foram realizadas três repetições. Os inóculos recuperados nos sistemas I e II foram testados quanto a nucleação de gelo. O teste consistiu no cultivo das bactérias reisoladas em NB e a transferência de 100µl desta cultura para tubos contendo 1ml de água destilada esterilizada a  $-5^\circ\text{C}$ . A formação imediata de cristais de gelo revelou o fenótipo INA<sup>+</sup> do isolado. Para o controle, foi utilizado 100µl de meio NB ausente de bactéria.

#### **Localização da bactéria:**

**Coleta de solo:** Dentro do campo de milho localizado nas dependências da Universidade Estadual de Londrina/Londrina-PR foram escolhidos 12 locais aleatórios representativos. Desses 12 locais foram coletados os primeiros 10 cm do solo próximo às raízes adventícias. Essas amostras foram misturadas e homogeneizadas e foi peneirado 0,5 kg dele. Dez gramas do material peneirado foram adicionadas em 95 mL de salina esterilizada e a suspensão fortemente agitada. Em seguida foi feita uma diluição em série dessa salina e 50µL das soluções foram semeadas em meio TSA e meio seletivo.

#### **Localização da bactéria na planta:**

**Sementes:** Cerca de 20 sementes oriundas de plantas doentes foram coletadas e desinfetadas com álcool 70% por 1 min, cloramina T 0,25% por 4 min e lavadas três vezes em água destilada esterilizada por 1 min (cada lavagem). A água da última lavagem foi plaqueada em meio TSA (Tryptic Soy Agar) para controle da metodologia de desinfecção. Com auxílio de um bisturi esterilizado segmentos das sementes foram retirados e transferidos para meio TSA. Sementes inteiras, após desinfecção também foram colocadas neste meio. As placas foram incubadas em estufa  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

**Folhas e Colmo:** Folhas foram coletadas a partir de plantas em três estágios, 10, 12 e 16 folhas, sendo que em cada estágio, três plantas foram utilizadas. Pequenos segmentos (2 g) foram recortados de uma folha da porção mediana da planta e incubados à temperatura ambiente por 2 h a 60 rpm em 100ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 acrescido 0,1% de peptona bacteriológica. O mesmo procedimento foi efetuado, porém desinfetando os segmentos foliares em álcool 70%, cloramina T 0,25% e três lavagens em água destilada esterilizada. Alíquotas de 100µl foram retiradas do tampão de incubação das folhas, transferidas para meio NA (Nutriente Ágar) e NAG (NA + 2,5% de glicerina) e incubadas a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , havendo três repetições para cada tratamento. De cada planta coletada foi também retirada uma porção do colmo que foi desinfetado externamente com álcool 70% e cloramina T 0,25%. Fragmentos internos do colmo foram transferidos para meio NA e NAG e incubados

a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Duas avaliações foram efetuadas no período de 24 e 48 hrs, estimando-se o número de colônias com morfologia semelhante a *P. ananatis*. As colônias com morfologia semelhante a *P. ananatis* foram isoladas e a atividade de INA verificada conforme metodologia descrita anteriormente.

### Resultados e Discussão

**Isolamento da bactéria *P. ananatis*:** O processo de isolamento de bactérias a partir de lesões anasarcas (Figura 1) foi bem sucedido, permitindo a obtenção de 20 isolados bacterianos a partir de 52 lesões. A desinfecção foliar durante o processo de isolamento foi satisfatória, o que pode ser evidenciado pela falta de crescimento bacteriano nos meios onde foram plaqueadas a água da última lavagem, demonstrando que as bactérias isoladas são originárias da lesão e não da superfície foliar. Foi selecionado um isolado, denominado de E2, originado de culturas de milho da Embrapa Soja Londrina – PR a fim de avaliar o crescimento em diferentes meios de cultivo. Trabalhos posteriores, desenvolvidos por outros autores, cujos resultados não estão aqui apresentados, confirmaram a patogenicidade deste isolado.

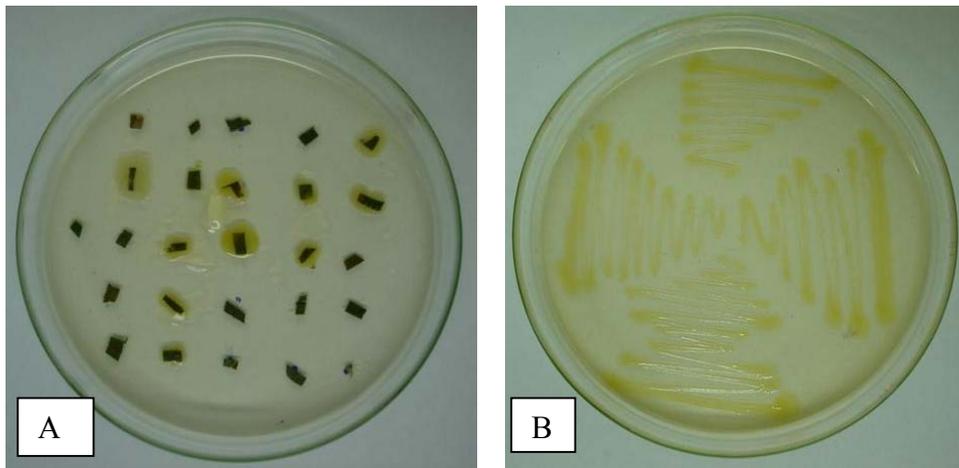


Figura 1– (A) Isolamento do agente causal da doença pinta branca do milho, a partir de lesões do tipo anasarca; (B) Isolado E2.

**Crescimento de *P. ananatis* em Laboratório:** O meio de cultura TSB mostrou-se mais eficiente para o crescimento bacteriano em todos os tempos avaliados (Tabela 1). TSB é um meio para isolamento e cultivo de uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias e fungos aeróbios, facultativos e anaeróbios. Este meio é amplamente usado para isolar bactérias de origem clínica e suporta o crescimento da maioria de bactérias fitopatogênicas.

Tabela 1 – Crescimento do isolado E2 em diferentes meios de cultura durante 10 horas de cultivo. Média de três repetições.

Meios	T0	T1	T2	T3	T4	T5
DYGS	0,003 bc*	0,016 bc	0,124 c	0,219 C	0,405 c	0,663 b
MSE	0,011 a	0,013 c	0,041 d	0,070 d	0,090 d	0,145 c
KADO	0,007 b	0,010 d	0,014 e	0,020 e	0,094 e	0,171 c

523	0,007 <b>b</b>	0,016 <b>bc</b>	0,126 <b>bc</b>	0,239 <b>B</b>	0,540 <b>b</b>	1,063 <b>a</b>
NB	0,003 <b>c</b>	0,018 <b>b</b>	0,132 <b>b</b>	0,213 <b>C</b>	0,406 <b>c</b>	0,641 <b>b</b>
TSB	0,011 <b>a</b>	0,032 <b>a</b>	0,148 <b>a</b>	0,336 <b>A</b>	0,713 <b>a</b>	1,000 <b>a</b>

\*Médias seguidas das mesmas letras na vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). T0 corresponde a primeira avaliação imediatamente após a instalação do experimento. T1-T5 correspondem às avaliações efetuadas a cada duas horas.

DYGS = meio DYGS; MSE= Meio Seletivo para *Erwinia*; KADO= Meio Seletivo para *Erwinia* sp. de Kado e Heskett (1970); 523= meio 523 de Kato e Heskett (1970); NB= Nutrient Broth; TSB= Tryptic Soy Broth

**Viabilidade *P. ananatis* em diferentes condições ambientais:** O teste de viabilidade em diferentes condições demonstrou que em meio líquido à temperatura de 12°C e a -6°C o isolado E2 manteve-se viável durante toda a condução do experimento, período correspondente a sete meses. A bactéria estocada em óleo manteve-se viável por um período de quatro meses que corresponde ao período de duração do experimento. O isolado E2 é uma bactéria INA<sup>+</sup> e manteve esta característica mesmo após os procedimentos de estocagem e após os testes de viabilidade.

**Localização da bactéria:**

**Solo:** As tentativas de isolamento da bactéria a partir do solo não tiveram sucesso, pois não foi observada nenhuma colônia com morfologia semelhante à bactéria *P. ananatis*, sugerindo que este patógeno possui algum outro mecanismo de sobrevivência e de disseminação.

**Localização da bactéria na planta:**

**Sementes:** Bactérias morfologicamente semelhantes a *P. ananatis* não foram localizadas nas sementes estudadas, demonstrando que a transmissão e disseminação destas não ocorre via semente.

**Folhas e colmo:** De acordo com os dados da Tabela 2 foram calculadas as médias de bactérias morfologicamente semelhantes à *P. ananatis* e das demais bactérias (denominadas outras) isoladas a partir de segmentos foliares de plantas de milho em diferentes idades (10 12 e 16 folhas). Observa-se que *P. ananatis* está presente na superfície da folha, em população crescente, indicando tratar-se de um microrganismo residente epifiticamente nas folhas e que por diversos fatores pode eventualmente desencadear injúrias em seu hospedeiro. As bactérias morfologicamente semelhantes a *P. ananatis* foram INA<sup>+</sup>. É sabido que bactérias INA<sup>+</sup> pertencentes ao ecossistema foliar podem atuar como patógenos tendo geralmente sua rede populacional aumentada quando associada com condições relativamente úmidas, particularmente após chuvas, alta umidade relativa do ar acompanhada de quedas de temperaturas. Isto pode ser observado nos resultados do presente trabalho com relação as bactérias crescidas em NA e NAG cujas folhas não sofreram processo de esterilização e portando evidenciando um aumento crescente na população de bactérias epifíticas. Na 1ª coleta, a temperatura média do dia foi de 26,1°C, sem chuva e a quantidade de bactérias morfologicamente semelhante a *P. ananatis* em meio NAG apresentou média de 1,67. Na 2ª coleta, com 23,9°C e sem chuva, a quantidade de bactérias de interesse em NAG apresentou média de 20. Na 3ª coleta, com 16,7°C e 4,8mm de chuva e dias precedentes constando chuva e baixas temperaturas, a quantidade de bactérias de interesse em NAG apresentou média de 113,43.

Tabela 2 – Estimativa do número de bactérias totais e do número de bactérias morfológicamente semelhantes a *P. ananatis* em segmentos foliares coletados a partir de plantas de milho em três diferentes idades (10, 12 e 16 folhas).

Tratamento foliar	Bactérias isoladas	Idade da planta de milho					
		10 folhas		12 folhas		16 folhas	
		NA	NAG	NA	NAG	NA	NAG
S/ esterilizar	<i>P. ananatis</i>	4,33	1,67	6,67	20,00	36,67	113,43
	Outras	10,67	16,33	100,00	110,00	143,33	240,00
Esterilizada	<i>P. ananatis</i>	0	0	3,33	0	0	0
	Outras	0	0	10	6,67	0	6,67
Colmo	<i>P. ananatis</i>	0	0,33	0	1,33	0	0
	Outras	2	2,33	2,67	4,00	1,67	1,67

NA = Nutriente Ágar

NAG = NA + 2,5% de glicerina

### Conclusões

O meio de cultura TSB mostrou ser o mais adequado para o crescimento do isolado E2. Em meio líquido, à 12°C e de -6°C, o isolado E2 manteve-se viável durante sete meses, e em óleo, durante quatro meses, períodos correspondentes à duração dos ensaios. *P. ananatis* encontra-se presente na superfície da folha, indicando tratar-se de um microrganismo residente epifiticamente nas folhas e que por diversos fatores pode eventualmente desencadear injúrias em seu hospedeiro.

### Literatura citada

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. Principais doenças na cultura do milho. **Circular Técnica da Embrapa**, n. 26, p. 07-08. 1997.

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**, vol. 149, p. 275-279. 2001.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR., V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, p. 16. 1986.