

Capim-colchão: hospedeiro alternativo de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho

Ricardo M Gonçalves¹, Eliseu S Pedro², Walter F Meirelles³ e Luzia D P Meirelles⁴

¹Mestrando em Agronomia, UEL, goncalves.agrouel@gmail.com ²Graduando em Agronomia, UEL, eliseupedro@hotmail.com ³Pesquisador Embrapa-Soja, Londrina, PR, walter@cnpso.embrapa.br ⁴UEL, CCB, Caixa Postal 6001, paccola@uel.br

Palavras-chave: *Zea mays*, bactéria, mancha de *Phaeosphaeria* e planta daninha

Resumo: A bactéria *Pantoea ananatis*, agente causal da Mancha Branca do Milho (MBM) foi recentemente isolada de lesões foliares de capim colchão (*Digitaria horizontalis*), uma gramínea encontrada em campos de produção de milho. As lesões mostraram-se semelhantes às lesões da MBM. O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade do capim colchão ser um hospedeiro alternativo do patógeno da MBM. Plantas de capim-colchão foram obtidas das entrelinhas da cultura do milho e transferidas para vasos em casa de vegetação. O isolado de *P. ananatis* foi obtido de lesão da MBM da fazenda experimental da Embrapa Soja – Londrina, PR. Após lavagem das folhas com sabão neutro, as lesões anasarcas foram retiradas e desinfetadas em álcool 70% (1 min), em T-cloramina (4 min) e 3 X em água esterilizada (1 min cada). Segmentos das lesões foram depositados em meio TSA. Após 24 h, colônias típicas da bactéria foram isoladas e purificadas. Uma suspensão bacteriana (10⁸ UFC) foi pulverizada sobre folhas (feridas com agulhas) do capim colchão. Após a inoculação, as plantas foram mantidas com câmara úmida por diferentes períodos em casa de vegetação, antes de serem submetidos por mais 24 horas em câmara climatizada a 15 °C. Após esta permanência em câmara climatizada, os vasos foram retornados para casa de vegetação, onde permaneceram até o surgimento dos sintomas. A partir do décimo dia da inoculação, sintomas da doença foram observados no capim-colchão. A bactéria foi reisolada, caracterizada e inoculada no cultivar de milho HS 200 em casa de vegetação. Os resultados permitiram confirmar que o capim-colchão é um hospedeiro alternativo de *P. ananatis*.

Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays L.*), superado apenas pelos Estados Unidos e China. É a terceira commodity mais produzida no país (FAO, 2007). Comparação entre a safra 2008/2009 e projeções para 2019/2020, as exportações terão um aumento de 80,3%, isso só será possível se houver aumento em produtividade (MAPA/AGE, 2010).

O Estado do Paraná é o maior produtor de milho do país, com uma produção na safra 2008/09 de 12,5 milhões de toneladas, produtividade média de 5.140 Kg/ha numa área plantada de 1.268,9 mil hectares na primeira safra e 3.024 Kg/ha numa área plantada de 1.514,1 mil hectares na segunda safra. Na safra 2008/09 o Paraná foi seguido em produção pelo Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e São Paulo (CONAB, 2009).

A doença Mancha Branca do Milho (MBM) encontra-se distribuída em quase todas as regiões produtoras do país. Em cultivares suscetíveis, esta doença apresenta alto potencial de redução da produtividade. As perdas provocadas pela doença MBM podem superar 60% da produção (CASELA et al., 2006). As condições climáticas que mais favorecem o desenvolvimento da doença são umidade relativa do ar acima de 60%, alta precipitação e temperaturas moderadas variando de 20 a 25 °C (COUTINHO e VENTER, 2009). Nestas



condições, o patógeno pode provocar seca prematura das folhas, como consequência, pode haver redução do ciclo da cultura e diminuição no peso e tamanho dos grãos.

A MBM é causada pela bactéria *P. ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). Esta é uma bactéria Gram-negativa, não esporulante, anaeróbia facultativa, formadora de colônias com crescimento mucoso e de coloração amarelo brilhante quando em meio de cultura. Os sintomas da MBM iniciam-se com lesões foliares verde escuro, com aspecto de encharcadas, do tipo anasarca, ficando acinzentadas e posteriormente necróticas de cor palha (PACCOLA-MEIRELLES, 2001). A bactéria normalmente é encontrada na forma epifítica (Wysmierski et al., 2006), porém ferimentos nas folhas originados pela ação abrasiva das partículas do solo, hábitos alimentares dos insetos e até mesmo o atrito planta-planta provocado pela ação de ventos fortes, podem resultar em epidemias da doença (PACCOLA-MEIRELLES, 2001).

A bactéria possui um mecanismo chamado quorum-sensing que permite a população epifítica comunicar quimicamente entre si. A principal substância sinalizadora produzida é denominada acil-homoserinas lactonas. Esta substância é empregada para controle da expressão de muitos caracteres fenotípicos importantes relatados para virulência e ataque do hospedeiro. Também é responsável pela produção de um exopolissacarídeo, que protege a célula bacteriana de mecanismos de defesa do hospedeiro e obstrui a circulação da seiva nas folhas que origina o tecido necrosado (POMINI et al., 2007).

Este patógeno apresenta a capacidade de produzir cristais de gelo em temperaturas onde esses cristais não poderiam ser formados (WYSMIERSKI et al., 2005). Esse fenômeno recebe o nome de “ice nucleation” ou nucleação de gelo (INA). Tal propriedade assume importância ainda maior, quando incide em culturas que não toleram o congelamento do meio intercelular, exteriorizando na forma de lesões do tipo anasarca, como no caso do milho. Esta propriedade é relacionada à virulência de bactérias fitopatogênicas. Para *P. ananatis* a proteína extracelular relacionada à nucleação de gelo denomina-se KUIN-3 (MURYOI et al., 2003).

P. ananatis já foi relatada causando sintomas tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. Culturas como, melão, arroz, cebola, aveia, eucalipto, e tomate tem sido descritas como hospedeiras de *P. ananatis* (WEELLS et al, 1987; BRUTON et al, 1991; WATANABE, KAWAKITA, SATO, 1996; GITAITIS, GAY, 1997; AZAD, HOLMES, COOKSEY, 2000; COTHER et al, 2004).

No ano de 2004 o pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Walter F. Meirelles observou, em áreas de plantio de milho na região de Londrina/PR, uma alta incidência de lesões foliares em *Digitaria horizontalis* (capim-colchão), uma erva daninha frequentemente encontrada em lavouras de milho. O que chamou a atenção do pesquisador foi a semelhança morfológica dessas lesões foliares com aquelas da Mancha Branca do Milho (FIGURA 1). Esta ocorrência em capim colchão foi posteriormente observada pelo mesmo pesquisador em Ponta Grossa/PR e em Passo Fundo/RS, porém com intensidade variada. O material foi então coletado e encaminhado ao laboratório de fungos da UEL/Londrina-PR e dele isolado uma bactéria com morfologia semelhante à *P. ananatis*. A partir de então vários isolados morfológicamente semelhantes à *P. ananatis* tem sido obtidos em lesões foliares de *D. horizontalis* (ROCHA e PACCOLA-MEIRELLES, 2008). Recentemente Meirelles coletou em plantios de milho na região de Campo Mourão/PR diferentes folhas de capim colchão todas portadoras de lesões semelhantes às descritas acima. Essas lesões mostraram uma variabilidade morfológica semelhante à variabilidade descrita por Paccola-Meirelles et al. (2002) para diferentes genótipos de milho. A *D. horizontalis* é considerada uma das ervas daninhas mais comuns nas lavouras de milho, dentre outras culturas (PASQUALETTO et al,



2001), mostrando-se predominante em campos experimentais de milho (OLIVEIRA et al, 2001). Esta gramínea poderia atuar como hospedeiro alternativo de *P. ananatis* nas lavouras de milho. Segundo Gitaitis et al. (2002) a *P. ananatis* pode sobreviver epifiticamente em ervas daninhas.

O gênero *Digitaria* inclui cerca de 300 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (DOROW, 2001). A espécie *D. horizontalis* e outras ervas daninhas já foram relatadas como fonte de inóculo do vírus do Mosaico Comum do Milho, colaborando assim para com o aumento da incidência desta moléstia (ALMEIDA et al., 2001).

O objetivo deste trabalho avaliar a possibilidade do capim-colchão (*Digitaria horizontalis*) ser um hospedeiro alternativo da bactéria *P. ananatis*, agente causal da Mancha Branca do Milho.



Figura 1: Folhas de plantas de capim colchão (*D. horizontalis*) mostrando lesões semelhantes às da Mancha Branca do Milho. (Foto obtidas por Meirelles na área experimental da Embrapa Soja em Londrina-PR).



Figura 2: Folhas de capim-colchão (*D. horizontalis*) mostrando a variabilidade morfológica das lesões semelhantes às da Mancha Branca do Milho. (Foto obtidas por Meirelles na área experimental da Cooperativa Coamo- Campo Mourão-PR).

Material e Métodos

Isolamento de *P. ananatis* a partir de lesões foliares em milho: Folhas sintomáticas de MBM, foram coletadas na fazenda experimental da Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil a partir do cultivar HS 200. Foram priorizadas as lesões em estágios iniciais da doença, como em anasarca, uma vez que a probabilidade das células bacterianas encontrarem-se viáveis é



XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. CD-Rom

maior e o número de contaminantes é reduzido. Na época de coleta destas lesões, as plantas de milho estavam na fase de enchimento de grãos. As folhas foram lavadas com esponja e sabão neutro, retiradas as lesões anasarcas e estas desinfetadas com álcool 70% por um minuto, seguido de quatro minutos em T-Cloramina e três enxágües, de um minuto cada, em água esterilizada. Segmentos das lesões medindo aproximadamente 1 por 3 mm, foram depositadas em meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA). Após 24 horas em B.O.D. à 30 °C, colônias típicas de *P. ananatis* foram isoladas e purificadas. Um isolado foi selecionado para a condução do experimento, o então denominado isolado RG1.

Inoculação de *P. ananatis* (isolada de lesões da MBM) em folhas de capim colchão: Mudanças de capim-colchão sadias foram obtidas das entrelinhas da área experimental da Embrapa Soja em plantio de milho. Estas mudas foram transplantadas para vasos em casa de vegetação na Universidade Estadual de Londrina (UEL). Após dois meses do plantio, quando as plantas mostraram-se vigorosas, procedeu-se a inoculação. O isolado RG1 de *P. ananatis* obtido de lesões da MBM foi cultivado em meio de cultura TSA por 24 horas e incubado à 30 °C. Foi ajustada uma suspensão (10^8 UFC/mL) em solução salina (0,85% de NaCl), pulverizada em casa de vegetação sobre as folhas do capim-colchão previamente feridas com agulhas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas com câmara úmida por diferentes períodos em casa de vegetação, antes de serem submetidos por mais 24 horas em câmara climatizada a 15 °C. Após esta permanência em câmara climatizada, os vasos foram retornados para casa de vegetação, onde permaneceram até o surgimento dos sintomas. Como controle, as folhas foram feridas e pulverizadas somente com solução salina.

Foram realizados três tratamentos:

Tratamento 1: após a inoculação, o vaso foi acondicionado em câmara úmida e deixado por 24 horas em câmara climatizada a 15 °C. Posteriormente o vaso foi transferido para casa de vegetação e transcorridas 24 horas, retirou-se a câmara úmida.

Tratamento 2: após a inoculação, o vaso foi acondicionado em câmara úmida e deixado por 24 horas na casa de vegetação. Transcorrido este período, foi transferido por mais 24 horas na câmara climatizada a 15 °C. O vaso foi transferido para casa de vegetação, retirado da câmara úmida, e deixado nestas condições até o surgimento dos sintomas.

Tratamento 3: após a inoculação, o vaso permaneceu 48 horas na casa de vegetação e transferido para câmara climatizada a 15 °C por mais 24 horas. Após estas 72 horas de câmara úmida o vaso foi transferido para casa de vegetação, e ali permaneceu até o surgimento dos sintomas.

Controle: Os controles seguiram a mesma metodologia dos tratamentos, porém as inoculações foram realizadas sem a bactéria, apenas com solução salina.

A avaliação foi realizada no décimo dia após a inoculação das plantas de capim-colchão com a bactéria *P. ananatis* isolada da MBM.

Testes do *Ice Nucleation*: Os isolados bacterianos foram cultivados em 10 mL de meio TSB por 12 horas à 30°C, 60 rpm. Uma alíquota de 200 µL da cultura foi adicionada em 1 mL de água destilada a -10 °C. A formação imediata de gelo no tubo de ensaio revelou o fenótipo INA⁺ do isolado. O controle foi realizado da mesma forma como os tratamentos, porém utilizando o meio TSB sem a bactéria.

Resultados e Discussão

Inoculação de *P. ananatis* (isolada de lesões da MBM) em folhas de capim colchão: O isolado de *P. ananatis* RG1 reproduziu sintomas semelhantes aos da MBM quando inoculado em capim colchão (Figura 3) sob condições controladas em casa de vegetação. Melhores resultados foram obtidos nos tratamentos 1 e 2 (Tabela 1).



Tabela 1: Reprodução de sintomas em capim colchão após diferentes tratamentos de inoculação de *P. ananatis* em casa de vegetação. O isolado de *P. ananatis* foi obtido de lesões foliares da Mancha Branca do Milho.

Tratamento	Tempo em casa de vegetação (horas)	Tempo em câmara climatizada a 15 °C (horas)	Tempo com câmara úmida (horas)	Sintomas
1	0	24	24	+ ^a
2	24	24	48	+
3	48	24	72	- ^b
Controle	24	24	48	-

^a+ crescimento bacteriano/^b- ausência de crescimento

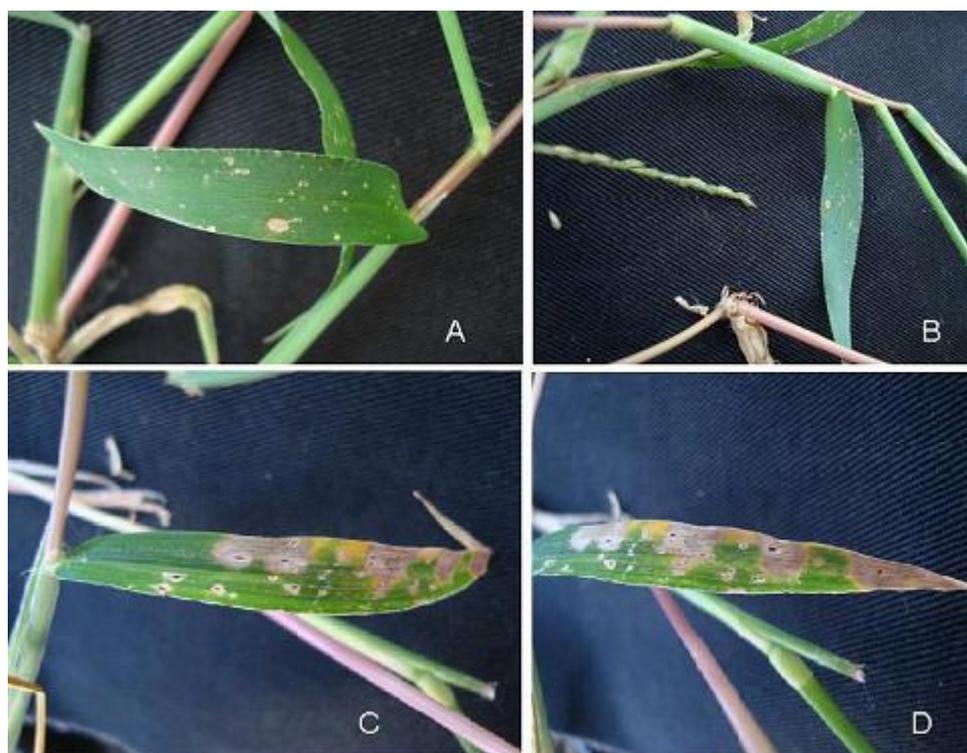


Figura 3: Lesões foliares em plantas de capim colchão resultantes da inoculação com *P. ananatis* isolada de lesões da Mancha Branca do Milho. A e B: Lesões em estágio inicial de necrose (10 dias após a inoculação) C e D: Lesões em estágio avançado de necrose.

A incidência e severidade dos sintomas foram maiores no tratamento 1 quando comparados ao tratamento 2. Este fato pode estar relacionado à atividade de nucleação de gelo que *P. ananatis* possui. As condições climáticas do tratamento 1 podem ter favorecido mais a atividade de nucleação de gelo pela bactéria, exteriorizando na forma de lesões necróticas mais severas.



A bactéria foi reisolada a partir das lesões do capim-colchão (Figura 4) seguindo a mesma metodologia usada para o isolamento a partir das lesões das folhas de milho. A bactéria mostrou-se morfológicamente semelhante à bactéria inoculada. Este reisolado recebeu a denominação de ReRG1. A Figura 4 esquematiza os passos utilizados neste trabalho. A bactéria ReRG1 foi inoculada em plantas de milho cultivar HS 200 com 30 dias de idade, de forma semelhante à inoculação no capim colchão. A Figura 5 mostra uma folha de milho apresentando sintomas resultantes da inoculação da bactéria ReRG1 reisolada do capim colchão.

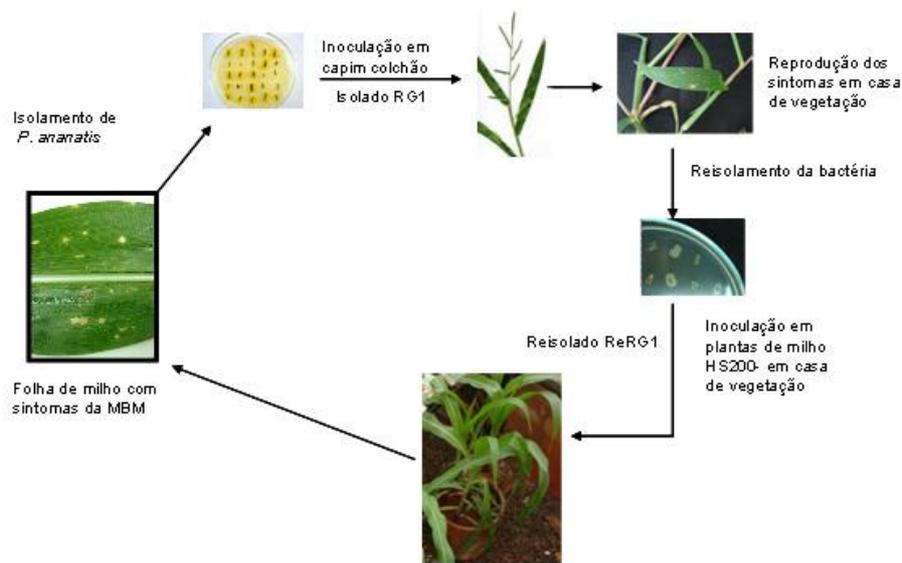


Figura 4: Esquema da inoculação de *P. ananatis*



Figura 5: Folha de milho apresentando lesões após inoculação de *P. ananatis* ReRG1

Teste Ice Nucleation: Tanto o isolado RG1 como aqueles reisolados de lesões do capim colchão obtidos da inoculação do isolado RG1 em casa de vegetação foram avaliados com relação a capacidade de nucleação de gelo. Ambos os isolados mostraram-se positivos para esta característica.

Como a doença MBM está disseminada em quase todo o território nacional e o capim-colchão também apresenta uma ampla distribuição, este pode ser descrito como sendo um hospedeiro alternativo para o patógeno.



Referências bibliográficas

ALMEIDA, A. C. L.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O. Fatores relacionados à incidência e disseminação do vírus do mosaico comum do milho. **Fitopatologia Brasileira**, 26:766-769, 2001.

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**, 84:973-979, 2000.

BRUTON, B. D.; WELLS, J. M.; LESTER, G. E.; PATTERSON, C. L. Pathogenicity and characterization of *Erwinia ananas* causing a post harvest disease of cantaloupe fruit. **Plant Disease**, 75:180-183, 1991.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. Doenças na cultura do milho. **Embrapa-Circular Técnica 83**, Embrapa, Sete Lagoas, MG, Brasil, 2006.

COUTINHO, T. A.; VENTER, S. N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Molecular Plant Pathology**, 3:325-335, 2009.

CONAB. Indicadores da agropecuária. **Companhia Nacional de Abastecimento**, Ano 18, n. 11, 2009.

COTHER, E. J.; REINKE, R.; MCKENZIE, C.; LANOISELET, V. M.; NOBLE, D. H. An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananas* and the first record of this pathogen on rice in Australia. **Australian Plant Pathology**, 33:495-503, 2004.

DOROW, T. C. *Digitaria* Heister ex Haller. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: HUCITEC, p. 292, 2001.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 26 abr. 2010.

GITAITIS, R. D.; GAY, J. D. First report of a leaf blight seeds talk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. **Plant Disease**, 81:1096, 1997.

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

MAPA/AGE. Projeções do Agronegócio, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 2010.

MURYOI, N.; MATSUKAWA, K.; YAMADE, K.; KAWAHARA, H.; OBATA, H. Purification and properties of an ice-nucleating protein from an ice-nucleating bacterium, *Pantoea ananatis* KUIN-3, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2:157-163, 2003.



OLIVEIRA, M. F.; ALVARENGA, R. C.; OLIVEIRA, A. C.; CRUZ, J. C. Efeito da palha e da mistura atrazine e metolachlor no controle de plantas daninhas na cultura do milho, em sistema de plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36:37-41, 2001.

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 Phytopatology**, 149:275-279, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MEIRELLES, W. F.; PARENTONI, S. N.; MARRIEL, I. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Reaction of maize inbred lines to the bacterium *Pantoea ananas* isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 2:578-590, 2002.

PASQUALETTO, A.; COSTA, L. M.; SILVA, A. A.; SEDIYAMA, C. S. Ocorrência de plantas daninhas na cultura do milho (*Zea mays* L.) em sucessão a culturas de safrinha no sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 31:133-138, 2001.

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 of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 1200-1204, 2007.

ROCHA, K. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. **Fatores envolvidos na reprodução da doença Mancha Branca do Milho**. In: Encontro de Bolsista do Programa de Apoio a Ações Afirmativas para Inclusão Social, 2008, Universidade Estadual de Londrina/ Centros de Ciências Biológicas, **Anais do III Encontro de Bolsistas do Programa de Apoio a Ações Afirmativas para Inclusão Social**. UEL-PR, CD-ROM, 2008.

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**, 31:459-462, 1996.

WELLS, J. M.; SHENG, W. S.; CEPONIS, M. J.; CHEN, T. A. Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. **Phytopathology**, 77:511-514, 1987.

WYSMIERSKI, P. T. ; ESCANFERLA, M. E.; PACCOLA-MEIRELES, L. D. Atividade de nucleação de gelo e produção de exoenzimas em *Pantoea ananatis*, agente causal da pinta branca do milho. In: 38º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2005, Brasília. **Fitopatologia Brasileira**, 30: 57-57, 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: XXVI Congresso nacional de milho e sorgo-II Simpósio Brasileiro sobre a lagarta do Cartucho -I Simpósio sobre *Colletotrichum graminicola*, 2006, Belo Horizonte. **Anais do XXVI Congresso nacional de milho e sorgo-II Simpósio Brasileiro sobre a lagarta do Cartucho -I Simpósio sobre *Colletotrichum graminicola*** CD ROM, 2006.

