

Pantoea ananatis, agente causal da Mancha Branca do Milho, sobrevive epifiticamente sobre as folhas de milho

Aline V. Sauer¹, Viviane Y. Baba¹, Eliseu S. Pedro¹, Walter F. Meirelles²; José E. F. Figueiredo², Ivanildo E. Marriel² e Luzia D. Paccola-Meirelles¹.

¹UEL, CP 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brasil. ²Embrapa Milho e Sorgo, CP 285, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: alinevanessasauer@hotmail.com.

Palavras-chave: *Zea mays*, seqüenciamento, Biolog, local de isolamento, semelhança

Entre as moléstias que atingem a cultura do milho, a Mancha Branca do Milho (MBM) apresenta destaque e importância, em consequência da alta incidência e prejuízos causados à produção, distinguindo-se como uma das principais doenças da cultura (Fantin, 1994; Fernandes e Oliveira, 2000). Uma bactéria formadora de colônias mucóides, de coloração amarelo brilhante, não esporulante, aeróbia facultativa e Gram negativa foi isolada por Paccola-Meirelles *et al* (2001) a partir de lesões do estágio inicial da doença, as lesões anasarcas. Esta bactéria, identificada como *Pantoea ananatis* é o agente causal da doença cujos sintomas iniciam-se com o aparecimento de lesões foliares aquosas do tipo anasarca, de coloração verde-escuro, as quais 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 e Oliveira, 2000) e, em ataques severos, as lesões podem coalescerem (Casela *et al.*, 2006). Pouco se sabe sobre a disseminação e sobrevivência de *P. ananatis* na cultura do milho. Segundo alguns autores, o inóculo primário tem origem nos restos culturais (Pereira *et al.*, 2005; Fernandes e Oliveira, 2000). Recentemente foi observado que *P. ananatis* reside epifiticamente nas folhas de milho (Escanferla *et al.*, 2006). As bactérias epifíticas localizam-se em sítios abrigados, como depressões entre as células epidérmicas e ao longo das nervuras, bem como na base dos tricomas, podendo sobreviver através de exsudatos de seu hospedeiro sem prejudicá-lo (Mariano e McCarter, 1991) e aumentar sua população na superfície foliar de plantas sadias do hospedeiro sem infectá-las, servindo como fonte de inóculo mesmo na ausência de sintomas (Kimura, 1981; Shuster e Coyne, 1974). O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de semelhança entre isolados oriundos de lesões com aqueles obtidos isolados epifíticos obtidos da superfície foliar de plantas sadias. Os resultados podem auxiliar no entendimento do ciclo epidemiológico da doença e suas interações entre patógeno e hospedeiro.

Materiais e Métodos

1- Isolamento de *P. ananatis* das lesões da Mancha Branca do Milho.

Isolados bacterianos oriundos de lesões da MBM foram obtidos a partir de lesões anasarcas, conforme a metodologia descrita por Paccola-Meirelles *et al.* (2001).

2- Obtenção dos isolados bacterianos epifíticos

Foram coletadas 5 folhas do 2º, 3º, 4º e 5º nó de 10 plantas, selecionadas aleatoriamente. 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. 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, à 30°C e 140 RPM. O extrato obtido foi filtrado em gaze esterilizado e centrifugado a 4500 RPM por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso 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+ eritromicina (0,04 mg/mL) + Ciclohexamida (0,005mg/mL). Afim de facilitar o isolamento de *P. ananatis* da superfície foliar, evitando o isolamento errôneo de espécies morfológicamente semelhantes, foi adicionado eritromicina ao meio de isolamento, seguindo as recomendações feitas por Sauer *et al.* (2009). Estes autores observaram que isolados de *P. ananatis* são resistentes à eritromicina na dosagem recomendada. As placas foram incubadas a 30°C ± 2 por 48 horas e após esse período, as bactérias foram selecionadas e diferenciadas de acordo com suas respectivas características morfológicas.

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

a. *Reação Gram*: Os isolados selecionados foram pré caracterizados através de meio seletivo Ágar MacConkey, utilizado para isolamento de bactérias Gram negativas. Placas contendo 20 mL de meio Ágar MacConkey foram inoculadas com todos os isolados, e incubadas a 30°C ± 2 por 48 horas.

b. *Caracterização quanto à utilização de sorbitol e glicerol*: Os isolados foram cultivados em presença de sorbitol e glicerol conforme descrição feita por Schaad *et al.* (2001) e incubados à 30°C até o período de avaliação. O critério de avaliação utilizado foi a alteração da coloração dos meios de cultura, de azul para amarelo. *P. ananatis* utiliza sorbitol e glicerol como fontes de carbono.

c. *Caracterização quanto à utilização de diferentes fontes de carbono (Biolog)*: Foram selecionados 15 isolados para serem testados em 95 diferentes fontes de Carbono. Os isolados foram cultivados em meio NA (Nutriente Agar) e posteriormente inoculados nas placas de BIOLOG (Microplaca GN2 – Biolog catalogo 1101) 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.

d. *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 min. A formação de gelo instantânea no tubo ao acrescentar a solução bacteriana, revelou o fenótipo INA positivo do isolado. Foram submetidos a teste 51 isolados, dos quais 11 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

e. *Análise molecular dos isolados*: A identidade molecular dos isolados cujas características morfológicas e bioquímicas se assemelhavam a *P. ananatis* foi realizada por meio do sequenciamento da região intergênica 16S/23S (Internally Transcribed Spacer region - ITS) utilizando os primers PanITS1 (5'-GTCTGATAGAAAGATAAAGAC-3'), específico para amplificação de rDNA de *Pantoea ananatis* (Gitaitis *et al.*, 2002) e o primer EC5 (5'-CGGTGGATGCCCTGGCA-3'), universal



para amplificação de rDNA bacteriano (Gurtler e Stanisich, 1996). Também foram utilizados os primers universais 16F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 16R1542 (5' - AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') para amplificação do gene ribossomal 16S. Para análise molecular foram selecionados 14 isolados da superfície epifítica de milho e 10 isolados provenientes de lesões. Os isolados foram cultivados em meio LB líquido (Luria-Bertani líquido: 1% Triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 1% NaCl em água. pH 7,0) por aproximadamente 8 horas. As amostras foram centrifugadas por 2 min a 14.000 RPM e o precipitado ressuscitado em 500 µL de tampão TNE (25 mM Tris, 100mM NaCl, 100mM EDTA - 5mL; 6,6 mL, 40 mL, adicionado de 200 mL de água). A seguir as amostras foram sonicadas por 1 min e acrescidas de 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e 100 µL de SDS 20% e incubadas por 30 min à temperatura ambiente. Após centrifugação por 2 min a 14.000 RPM, a fase aquosa foi recuperada, acrescida de 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico e misturadas em vortex por 30 segundos. O material foi novamente centrifugado a 14.000 RPM por 2 min e a fase aquosa superior foram adicionados 500 µL de fenol: clorofórmio (1:1). Agitou-se em vortex por 30 segundos, seguido de uma centrifugação por 2 min a 14.000 RPM. A fase aquosa superior foi recuperada e adicionada de 500 µL de clorofórmio. Misturou-se em vortex por 30 segundos e centrifugou-se por 2 min a 14.000 RPM. A fase superior foi recuperada e acrescida de 2,5 volumes (1.250 µL) de etanol absoluto. O material foi misturado por inversão e armazenado à -20°C por 2 horas. Em seguida o material foi centrifugado por 15 min a 14.000 RPM, descartando-se o álcool. As amostras foram lavadas rapidamente com etanol 70%, deixadas para secar o sedimento (pellet) e ressuscitado em 100 µL de água autoclavada. A quantificação do DNA foi realizada por leitura espectrofotométrica (OD260/280) e a qualidade foi determinada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A amplificação do rDNA por meio de PCR foi realizada empregando 25 ng de DNA genômico bacteriano mais 2,5 µL de tampão de PCR 10X (20 mM Tris-HCl, pH8,4; 50 mM KCl), 2,0 µM cada primer, 25 mM MgCl₂ e 1 U *Taq* DNA polimerase (*Phoneutria*, Belo Horizonte, Brasil) em volume final de 25 µL. A reação de PCR foi incubada no termociclador modelo PTC-100 (MJ Research, MS, USA) nas seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação do DNA a 94 °C durante 1 min seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C (anelamento), e 2 min a 72 °C (extensão). Finalmente a reação foi incubada por 10 min a 72 °C. O DNA amplificado foi analisado por eletroforese horizontal a 6 V/cm², em gel de agarose a 0,8% (wt/v) em tampão TAE (0,004 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA, pH 8,0) e conteúdo brometo de etídio (0,5 mg/L). Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta, fotografados. Fragmentos de gel contendo a banda de DNA amplificado foram cortados e o DNA foi purificado com GeneClean kit II (BIO 101, Vista, CA, USA). O sequenciamento foi realizado utilizando todos os primers descritos anteriormente e também os primers universais 16F518 (5' - CAGCAGCCGCGGTAATAC-3') e o primer 16R928 (5'- CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'). Para as reações de sequenciamento um mix foi preparado para cada reação (2µL Mix Big Dye Terminator versão 3.1, 1µL Primer (5 pmoles/µL), 2µL de tampão de diluição, e q.s.p 15 µL de H₂O). Alíquotas de 9 µL do mix foram distribuídas em tubos contendo 1 µL DNA (~200 ng/µL). As amostras foram colocadas em Termociclador, utilizando-se do programa: 96°C, 20 segundos; 50°C, 10 segundos; 60°C, 4 min por 30 ciclos. Em seguida, em cada tubo de reação foi adicionado 40µL de isopropanol 75%, em temperatura ambiente por 15 min. As amostras foram centrifugadas por 20 min, 14.000 RPM à 20°C, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de etanol 70% (Merck) e centrifugado por 10 min a 14.000 RPM, 20°C. Após o descarte do sobrenadante o material foi secado em temperatura ambiente no escuro e ressuscitado em 10µL de formamida Hi-Di; O DNA foi desnaturado a 95°C por 5 min e resfriado no gelo antes de injeção no seqüenciador ABI3100.

Cada fragmento de DNA amplificado foi sequenciado pelo menos oito vezes (forward e reverse). Para cada isolado, as sequências foram alinhadas e editadas utilizando o programa CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Os contigs de cada isolado foram analisados no



NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa BLASTn para pesquisa de similaridade de sequencias no GenBank.

Resultados e Discussão

Os isolados de *P. ananatis* obtidos das lesões da MBM mostraram-se resistentes à eritromicina na concentração de 0,004 mg /mL de meio de cultura (Sauer *et al.*, 2009). Nesta concentração ocorreu inibição do crescimento de outras espécies bacterianas avaliadas, mas permitiu o crescimento de *P. ananatis*. Desta forma foi possível selecionar 24 isolados de bactérias epifíticas morfologicamente semelhantes á *P. ananatis*.

Tanto isolados epifíticos como aqueles obtidos da lesão da MBM desenvolveram-se no meio seletivo MacConkey, sendo classificados como Gram negativos.

Para os teste de utilização de sorbitol e glicerol, foram selecionados 24 isolados epifíticos e 10 isolados de lesões. As amostras submetidas ao teste foram positivas para a utilização das fontes de carbono utilizadas neste experimento. Em geral as espécies pertencentes ao gênero *Pantoea* apresentam pigmentação amarela, mas comportam-se de maneira distinta quanto à 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 facilmente 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) (Schaad *et al.*, 2001). Todos os 24 isolados epifíticos e todos os 10 isolados obtidos de lesões da MBM comportaram-se de forma semelhante quanto a utilização de sorbitol e glicerol, comprovando a semelhança entre os mesmos.

A determinação da propriedade de nucleação de gelo foi avaliada em 51 isolados (40 isolados da superfície epifítica e 11 obtidos diretamente de lesões da MBM). Apresentaram a característica INA⁺ 27 dos isolados epifíticos e 8 dos isolados da MBM. Essa característica é variável dentro e entre isolados, e dependente da concentração de nucleantes de gelo presentes nas bactérias no momento dos testes.

A análise pelo BIOLOG para utilização de fontes de carbono, permitiu o agrupamento dos isolados através do dendograma de similaridade, revelando a existência de apenas um grande grupo, este, constituído por vários subgrupos, onde apenas o isolado E3L2H1 foi agrupado separadamente (Figura 1). Dos 15 isolados avaliados neste, 10 apresentaram coeficiente de similaridade próximo a 80%. Não houve distinção entre grupos dos isolados obtidos de lesões da MBM e de isolados obtidos da superfície epifítica.



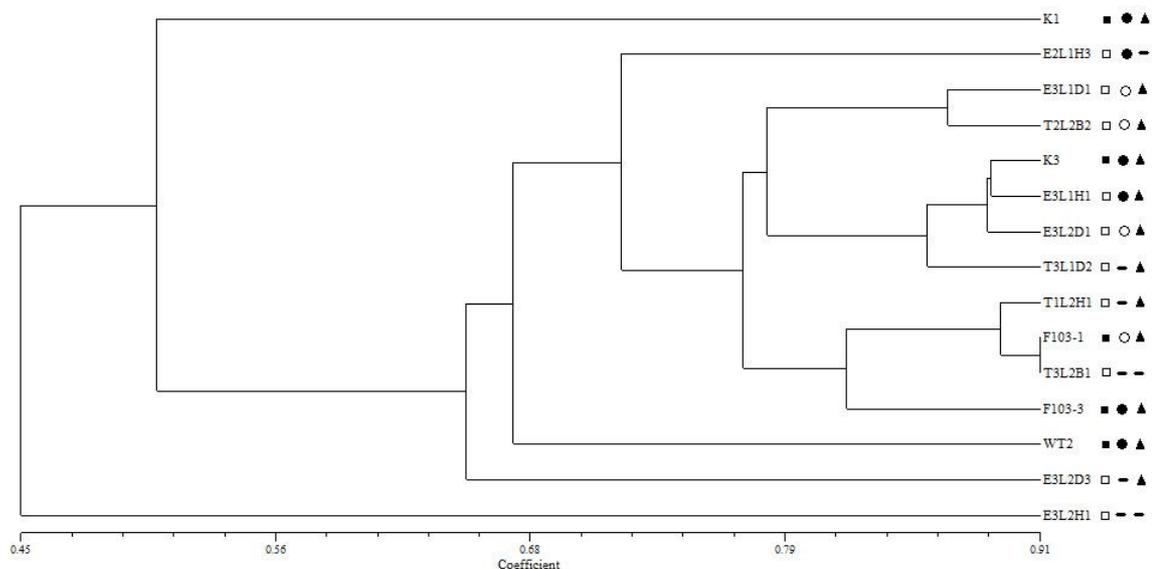


Figura 1. Dendrograma mostrando a relação entre 15 isolados de *P. ananatis* oriundos da superfície foliar e aqueles obtidos diretamente das lesões da Mancha Branca do Milho, baseado na utilização diferencial das 95 fontes de carbono disponíveis nas Microplacas de Biolog GN. Isolados diretamente da lesão (■). Isolados epifíticos (□). Isolados INA+ (●). Isolados INA- (○). Isolados positivos para utilização de sorbitol e glicerol como fontes de carbono (▲). Isolados não testados para esta característica (—).

Para as análises moleculares e sequenciamento foram utilizados 14 isolados da superfície epifítica de milho e 10 isolados de lesões da MBM. As análises moleculares permitiram observar que o primer Pan ITS1, específico para identificação de *Pantoea ananatis* (Gitaitis *et al.*, 2002), também amplifica a região ITS de *P. stewartii* subespécie *stewartii* (Walcott *et al.*, 2002). No presente estudo, os primers PanITS1 e EC5 produziram amplicons cujos tamanhos variaram entre 400 e 600 pares de bases para a maioria dos isolados estudados. Somente amplicons de aproximadamente 400 pb e de 612 pb corresponderam à região ITS. A variação de tamanho dos amplicons pode ser explicada pelo fato de existirem seis cópias diferentes de rDNA em *P. ananatis*. Além disso, sequências diferentes foram obtidas para um mesmo amplicon confirmando a existência de multicópias de rDNA. Em *P. stewartii* é descrita apenas uma cópia de rDNA.

Treze isolados da superfície foliar apresentaram elevada identidade de sequências com *Pantoea ananatis*, variando entre 98% e 100%. O DNA de um dos isolados não amplificou a região ITS do rDNA quando os primers PanITS1 e EC5 foram utilizados. Nesse caso os primers universais 16F27 e 16R1542 foram empregados para amplificação parcial do gene ribossomal 16S e aproximadamente 1500 pares de bases foram sequenciados. A análise das sequências geradas revelou 100% de identidade com *Bacillus pumilus*. Com relação aos isolados de lesões, todos amplificaram fragmentos de rDNA quando os primers PanITS1 e EC5 foram utilizados. A análise das sequências de DNA revelou elevada identidade (97%-100%) com *Pantoea ananatis*.

Com relação à espécie *P. stewartii* subesp. *stewartii*, a identidade das sequências de DNA amplificado utilizando os primers PanITS1 e EC5 foi menor do que a identidade com *P. ananatis* e variou entre 87-92%. Além disso, a existência de uma região de aproximadamente 35 pares de bases nos rDNAs amplificados dos isolados epifíticos e das lesões, presente em uma das seis



cópias de rDNA de *P. ananatis* mas ausente em *P. stewartii*, possibilita concluir que os isolados são realmente *P. ananatis*.

Conclusões

A caracterização dos isolados epifíticos, demonstrou que estes são semelhantes aos isolados obtidos diretamente das lesões da MBM. O sequenciamento das bactérias isoladas das lesões da MBM e das isoladas da superfície foliar permitiram concluir, com exceção de um dos isolados epifíticos, os demais são pertencentes à espécie *P. ananatis*. Trabalhos anteriores demonstram que, quando a população de *P. ananatis* atinge uma determinada concentração celular na superfície foliar do milho, em condições ambientais favoráveis, os sintomas da mancha branca se manifestam.

Referencias bibliográficas

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/dfoliares.htm>> Acesso em: 16 out. 2009.

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.

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.; OLIVEIRA, E. Principais doenças na cultura do milho. **Circular técnica Embrapa**, Londrina, v. 2, p. 80, 2000.

GITAITIS, R. *et al.* Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. **Crop Protection**, v.21, p. 983-989, 2002.

GURLER, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, v.142, p.3-16, 1996.

KIMURA, O. Importância das populações "residentes" de fitobactérias na epidemiologia de enfermidades bacterianas. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p. 310-311, 1981.

MARIANO, R. L. R.; McCARTER, S. M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato and weeds species. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p. 86-92, 1991.



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.

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.

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.

SAUER, A. V., Baba, V. Y., Pedro, E. S., Meirelles, W. F., Paccola-Meirelles, L. D. Monitoramento da população epifítica de *Pantoea ananatis* agente causal da mancha branca do milho In: XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2009, Rio de Janeiro- RJ. **Tropical Plant Pathology**. Brasília- DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. v. 34. p. S1 - S370

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

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p. 199-221, 1974.

WALCOTT, R. R., GITAITIS, R. D., CASTRO, A. C., SANDERS, F. H., Jr., and DIAZ-PEREZ, J. C. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. **Plant Disease**. v86, p. 106-111. 2002.

