

Sobrevivência de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho, em restos culturais de milho

Aline V. Sauer¹, José E. F. Figueiredo², Vivine Y. Baba¹, Eliseu S. Pedro¹, Walter F. Meirelles² 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: sequenciamento, palha, pinta branca do milho, inoculo

O milho se destaca entre os principais cereais por sua importância econômica, social e diversidade de utilização (Duarte, 2000). O progresso do surgimento de novos problemas para a cultura do milho, principalmente com relação às doenças, é proporcionado por semeaduras antecipadas sob irrigação, semeaduras da safra de verão e o aumento da semeadura da safrinha (Pereira *et al.*, 2005). Em consequência da alta incidência e prejuízos causados à produção, a Mancha Branca do Milho atualmente se distingue como uma das principais doenças da cultura (Fernandes e Oliveira, 2000). *Pantoea ananatis* tem sido descrita como sendo o agente causal dessa doença (Paccola-Meirelles *et al.*, 2001) e seus sintomas iniciam-se pelo aparecimento de lesões foliares aquosas do tipo anasarca, de coloração verde-claro que posteriormente tornam-se necróticas de cor palha (Fernandes e Oliveira, 2000). 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 *et al.*, 2005; Fernandes e Oliveira, 2000). Conhecer o funcionamento de agroecossistemas, bem como identificar nichos de sobrevivência de fitopatógenos e suas interações com hospedeiro e ambiente, são fundamentais para estabelecer práticas adequadas de manejo visando seu controle (Valarini e Spadotto, 1995). 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 e Oliveira, 2000). O objetivo deste trabalho foi investigar a possível sobrevivência de *P. ananatis* em resíduos de plantas desta cultura, a fim de entender o ciclo de vida deste patógeno no presente hospedeiro.

Materiais e métodos

Obtenção dos isolados bacterianos a partir de lesões da Mancha Branca do Milho

Isolados bacterianos oriundos de lesões da Mancha Branca do Milho foram obtidos conforme metodologia descrita por Paccola-Meirelles *et al.* (2001).

*Isolamento de *P. ananatis* de resíduos de plantas de milho*

O experimento foi conduzido no campus da Universidade Estadual de Londrina, localizada na cidade de Londrina-Pr, com coordenadas geográficas 23° 19' 31" de latitude sul, 51° 11' 59" de longitude oeste e 560m de altitude. Diferentes híbridos de milho foram semeados (DAS 657, HS 200 e 2B 710) em uma área de aproximadamente 25m², a qual foi cercada com tela de arame do tipo alambrado com finalidade de maximizar a preservação e a integridade dos restos culturais. As plantas foram afetadas naturalmente pela Mancha Branca



do Milho e o material infectado foi coletado a partir do dia da colheita de grãos, onde as plantas já se encontravam senescentes. As coletas foram realizadas aos 1, 15, 30, 45, 60 e 75 dias. As folhas de milho coletadas nas respectivas datas foram levadas ao laboratório, onde foram selecionadas para os procedimentos de isolamento. Segmentos foliares contendo lesões da Mancha Branca do Milho no estágio 4 (Paccola-Meirelles *et al.*, 2001) foram recortados. As bordas dos segmentos foliares (aproximadamente 1mm) foram retiradas com auxílio de um bisturi estéril e plaqueadas em meio TSA⁺ eritromicina (0,04 mg/ mL) + Ciclohexamida (0.005mg/mL) (Sauer *et al.*, 2009). As placas foram incubadas em BOD à 30°C ± 2°C, por 24 horas. As bactérias foram purificadas e mantidas em meio TSA. A fim de avaliar a sobrevivência de *P. ananatis* na superfície epifítica de restos vegetais de plantas de milho, as folhas contendo ou não lesões, foram segmentadas até completar 0,5g de massa seca. Estes segmentos foliares foram adicionados à 20mL 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, à 140 RPM e 30°C ± 2°C. O extrato obtido foi filtrado em gaze esterilizado e centrifugado a 4500 RPM por 15 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+ Ciclohexamida (0.005mg/mL) . Para cada híbrido foram utilizadas três placas que foram incubadas em BOD à 30°C ± 2°C, por 24 horas. Realizou-se a purificação das bactérias e estas foram mantidas em meio TSA.

Determinação da atividade de nucleação de gelo dos isolados bacterianos

Para determinar a atividade de nucleação de gelo dos isolados, foram selecionados 5 isolados de lesões anasarcas da Mancha Branca do Milho e 6 isolados em restos vegetais da cultura do milho. 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 a 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⁺ do isolado. O controle consistiu na adição de meio TSB livre de bactéria nos tubos contendo água destilada estéril.

Análises moleculares

Para análise molecular foram selecionados seis isolados presentes em restos culturais do milho. A identidade molecular dos isolados cujas características morfológicas e bioquímicas se assemelhavam à *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 & Stanisich, 1996). Também foram utilizados os primers universais 16F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 16R1542 (5' - AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') para amplificação do gene ribossomal 16S.

Para extração do DNA genômico, 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 ressuspenso 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 ressuspenso em 100 µL de água autoclavada. A quantificação do DNA foi realizada por leitura espectrofotométrica (OD_{260/280}) 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 e 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).

Para as reações de seqüenciamento um mix foi preparado para cada reação (2µL Mix Big Dye Terminator versão 3.1, 1µL Primer (5 moles/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 ressuspenso 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 seqüenciado pelo menos oito vezes (forward e reverse). Para cada isolado, as seqüências foram alinhadas e editadas utilizando o programa CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Os contig 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



Foram obtidos cinco isolados de lesões da Mancha Branca do Milho. Na palhada, restos vegetais da cultura do milho (até 60 dias pós-colheita), foram obtidos isolados com morfologia semelhante à *P. ananatis*. Os isolados foram obtidos nos três híbridos utilizados neste experimento. Aos 75 dias, o material a campo já se encontrava em avançado estágio de decomposição, fato este que dificultou a coleta e o conseqüente isolamento do material. Na primeira coleta do material residual, observou-se maior facilidade de isolamento da bactéria. Com o passar do tempo a dificuldade de isolamento foi aumentando em função da degradação do material que permaneceu exposto no campo. Dos cinco isolados de lesões anasarcas da Mancha Branca do Milho, apenas o F103-1 não apresentou atividade de nucleação de gelo. Todos os isolados analisados provenientes dos restos vegetais da cultura do milho manifestaram atividade de nucleação de gelo. Este fenótipo possui um importante papel na virulência destas espécies (Edwards *et al.*, 1994). Os danos às plantas podem ocorrer devido a formação de gelo nos espaços intercelulares em temperaturas onde este fenômeno normalmente não ocorreria (Lindow *et al.*, 1982; Lindow, 1987).

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.

Dois isolados dos restos culturais do milho apresentaram elevada identidade de sequências de DNA da região ITS com *Pantoea ananatis* (97% e 100%). Os demais isolados não apresentaram DNA amplificado com os primers PanITS1 e EC5 e por isso utilizou-se dos primers universais 16F27 e 16R1542 para amplificação parcial do gene ribossomal 16S. Um fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases foi amplificado e sequenciado. Esses isolados apresentaram elevada identidade de sequências de DNA com *Pantoea agglomerans* (99%) e *Pseudomonas fulva* (98%). O sequenciamento do gene 16S de um dos isolados previamente identificado como *P. ananatis* por meio do sequenciamento da região ITS, confirmou a identidade do isolado.

A identidade das sequências de DNA amplificado com os primers PanITS1 e EC5, com a espécie *P. stewartii* subesp. *stewartii* foi menor do que a identidade com *P. ananatis* e variou entre 87-89%. Além disso, a existência de uma região de aproximadamente 35 pares de bases nos rDNAs amplificados, 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*.

Estes resultados demonstram que *P. ananatis* sobrevive nos restos vegetais da cultura do milho mesmo sob condições desfavoráveis e decomposição do material no campo. Este mecanismo de sobrevivência é conhecido por latência, onde em algumas situações, a atividade metabólica do indivíduo é reduzida ao mínimo (Romeiro, 2005).

Conclusões

P. ananatis sobrevive nos restos vegetais da cultura do milho, atuando deste modo, como fonte de inóculo nos campos agrícolas. Estas bactérias apresentaram fenótipo INA⁺ e as análises moleculares, por meio do sequenciamento da região ITS do rDNA possibilitaram concluir que os isolados analisados são de fato *Pantoea ananatis*.



Referências Bibliográficas

- 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.
- EDWARDS, A. R.; VAN den BUSSCHET, WICHMAN, H. A.; ORSER, C. S. Unusual Pattern of Bacterial Ice Nucleation Gene Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, p. 911-920, 1994.
- FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Principais doenças na cultura do milho. **Circular Técnica Embrapa**, 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.
- GURTLER, 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.
- 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**, v. 70, p. 1090-1093, 1982.
- LINDOW, S. E. Competitive Exclusion of Epiphytic Bacteria by Ice-Pseudomonas syringae Mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2520-2527, 1987.
- 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**, 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**, v. 34, p. S1-S370, 2009.
- VALARINI, P. J; SPADOTTO, C. A. Identificação de fitopatógenos em áreas irrigadas de Guaíra, SP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, p. 1239-1243, 1995.

