

Diagnóstico Molecular de *Pantoea ananatis*

José Edson Fontes Figueiredo¹; Gabriella Máximo Claudino Costa²; Luzia Doretto Paccola-Meirelles³; Marielle Martins Marcondes⁴; Talita Coeli Dangelis de Aparecida Ramos⁵; Fabrício Eustaquio Lanza⁶; Carla Lima Corrêa⁷ e Lorena de Oliveira Moura⁸

¹Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Jeff@cnpms.embrapa.br ²⁻⁵UNIFEMM, Sete Lagoas, MG. galbismaximo@gmail.com, talita.tchely@hotmail.com, ³UEL, Londrina, Pr. Paccola@uel.br ⁴Mestranda, UNICENTRO, Guarapuava, PR. m_lelinha@hotmail.com ⁶Doutorando-UFV, Viçosa, MG. falanza@gmail.com, ⁷Pós-doutoranda, UFLA, Lavras, MG. correa.carla@yahoo.com.br, ⁸UFSJ, Sete Lagoas, MG. lorena.om@hotmail.com

RESUMO - A mancha-branca do milho (MBM) é uma doença amplamente distribuída e causa redução da produtividade em vários países. A bactéria *Pantoea ananatis* é o agente etiológico da MBM e sua detecção no estágio inicial da cultura é importante para manejo da doença. Este estudo objetivou desenvolver um teste molecular para diagnóstico rápido e preciso de *P. ananatis*. Foi desenhado um par de iniciadores para amplificar a região espaçadora (ITS) dos genes ribossomais 16S-23S *P. ananatis* e a especificidade dos iniciadores foi testada empregando isolados de *P. ananatis* do milho, sorgo e *Digitaria* sp., DNA total de pool de lesões MBM de milho e de lesões semelhantes à MBM em sorgo e *Digitaria* sp. e DNAs de espécies de referência do gênero *Pantoea*. Para cada isolado foi observado apenas um fragmento de DNA de 361 pares de bases (pb) ou 389 pb em cada amostra das espécies *P. ananatis* e *P. allii*. A identidade dos amplicons foi confirmada através de sequenciamento. O resultado forneceu uma ferramenta simples para diagnóstico de isolados de *P. ananatis* e para diagnóstico direto de *P. ananatis* associado com lesões MBM em milho, sorgo e *Digitaria* sp.

Palavras-chave: Mancha-branca do milho, Sorgo, *Digitaria* spp., PCR

Introdução

A doença mancha-branca do milho (MBM) causa redução de até 60% da produtividade nessa cultura e encontra-se distribuída em quase todas as regiões brasileiras (POMINI *et al.*, 2007; SAWAZAKI *et al.*, 1997). A bactéria *Pantoea ananatis*, agente causal da doença mancha-branca do milho (MBM) (PACCOLA-MEIRELLES *et al.*, 2001), constitui sério problema para os produtores em vários países (ALIPPI e LÓPEZ, 2010; KRAWCZYK *et al.*, 2010; PÉREZ-Y-TERRÓN *et al.*, 2009). Em 2011, Cota e colaboradores descreveram, pela primeira vez, os sintomas da doença em sorgo.

P. ananatis pode ser encontrada como saprófita, em restos culturais, ou nas formas epifítica, endofítica ou patogênica, em diferentes estádios de desenvolvimento do hospedeiro. Infecções latentes de *P. ananatis* nas folhas usualmente servem como inóculo para epidemias (COUTINHO e VENTER, 2009). Como saprófita, *P. ananatis* vivendo nos restos culturais pode causar doenças mais cedo na cultura do milho. Recentemente a bactéria foi isolada de *Digitaria horizontalis* e *D. insulares*, que são plantas invasoras associadas ao milho (GONÇALVES *et al.*, 2010). Portanto, a detecção de inóculos nos estádios iniciais da cultura

é importante para predição e manejo da doença.

Tradicionalmente, a identificação de espécies do gênero *Pantoea* tem sido feita por meio de análise de diferentes caracteres fenotípicos e por meio de testes bioquímicos inconclusivos. Esses métodos demandam muito tempo e necessitam de análises realizadas por profissionais especializados para realizarem a difícil identificação dos isolados ao nível de espécies e estabelecer relações filogenéticas com os grupos superiores (BRADY, 2005). Por isso, torna-se necessário desenvolver um teste rápido, preciso e sensível para diagnóstico de *Pantoea ananatis*. Neste trabalho é descrito um teste molecular simples, rápido e acurado para diagnóstico conclusivo de *P. ananatis* em milho, sorgo e *Digitaria* sp., que pode ser executado por técnicos de laboratório, sem a necessidade de conhecimento profundo de taxonomia.

Material e Métodos

P. ananatis isolada de sorgo, pool de lesões MBM de milho e pool de lesões semelhantes à MBM em sorgo e *Digitaria* sp. foram coletados de plantas nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil.

P. ananatis isolada como epifítica, como saprófitas em restos culturais de milho e isoladas de lesões MBM de plantas de milho, sorgo e de plantas invasoras do gênero *Digitaria* sp. foram obtidas da coleção de microrganismos do Laboratório de fungos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. Em ambas as coleções, os isolados bacterianos foram identificados por métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares (sequenciamento de rDNA).

Cartões FTA (Whatman Inc., Clifton, USA) contendo esfregaços de culturas de linhagens de referência das seguintes espécies: *Pantoea agglomerans* (PNG 06-3, PNG 09-1 e PNG 97-2), *P. ananatis* (PNA 08-2, PNA 97-5 e PNA 99-13), *P. stewartii* (ES 02-1 e ES 02-2) e, *P. allii* (Bsf 24, HH 24, BD 380 e BD 390^T= LMG 24248^T) foram fornecidos pelo Dr. Ronald D. Gitaitis (University of Georgia, College of Agricultural & Environmental Sciences, Tifton, GA, USA).

DNA genômico das linhagens de referência das espécies: *P. vagans* (105^T= LMG 24199^T), *P. allii* (BD 390^T= LMG 24248^T) foram fornecidos pela Dra. Teresa A. Coutinho (Department of Microbiology and Plant Pathology Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria, South Africa).

DNA genômico de isolados bacterianos brasileiros e DNA total de 0.5 g de pool de lesões esterilizadas superficialmente foram extraídas pelo método CTAB

(hexadecyltrimethylammonium bromide) (DOYLE e DOYLE, 1990). DNA de amostras em cartões FTA foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (Wattman Inc., Florham Park, NJ, USA) e usados diretamente nas reações de PCR.

O iniciador Forward, denominado por ANAF: 5'-CGTGAAACTACCCGTGTCTGTTGC-3' foi desenhado por meio de alinhamento de sequências das regiões ITS dos genes rRNA 16S e 23S de *Pantoea* spp. e anela com apenas uma das sete cópias de rDNA de *P. ananatis*, em uma região específica contendo rearranjo genômico. O iniciador Reverse universal EC5: 5'-TGCCAGGGCATCCACCGTGTACGCT-3' (GÜRTLER e STANISH, 1996) foi modificado pela adição de oito nucleotídeos (letras em destaque) na extremidade 3'. A especificidade dos primers foi analisada contra todas as sequências de DNA depositadas no GenBank por meio do programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

As reações de PCR e as condições de incubação foram realizadas de acordo com o protocolo padrão empregado no Laboratório de Bioquímica Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, com 60 °C para a temperatura de anelamento e 0.5 unidade de Taq DNA polymerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brazil). Alíquotas de 20 µL das reações de PCR foram aplicadas em géis de agarose a 0,8% (w/v), contendo 3 µl de brometo de etídio na concentração de 10mg/mL e resolvidos em tampão Tris-Acetate-EDTA (TAE), a 60v por 90 minutos. Os amplicons, cortados dos géis de agarose, foram purificados com o DNA gel extraction kit (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD, USA) e sequenciados duas vezes em cada direção (forward e reverse), com Big Dye Terminator Cycle Sequencing, em sequenciador ABI Prism 3100 automatic sequencer, de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências consenso geradas com o programa CAP3 (HUANG e MADAN, 1999) foram depositadas no GenBank e receberam os números de acesso JN622029 a JN622037. A similaridade das sequências foi avaliada com o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997, <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Resultados e Discussão

A análise com o programa primer-blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para estimar os produtos de PCR com os iniciadores ANAF e EC5-modificado revelou dois possíveis amplicons para a mesma cópia da região ITS do genoma de *P. ananatis*: 360 pb para a linhagem LMG20103 (GenBank acesso CP001875) e 388 pb para a linhagem AJ13355 (GenBank acesso AP012032.1).

Os produtos das reações de PCR com os iniciadores ANAF e ANAR para todas as amostras identificadas como *P. ananatis* (isolados do milho, sorgo e *Digitaria* sp.; pool de lesões MBM de milho e lesões semelhantes à MBM em sorgo e *Digitaria* sp.) apresentaram apenas um amplicom com tamanho próximo ao esperado (361 pb ou 389 pb), confirmando a análise com Primer-BLAST. O padrão eletroforético dos produtos de amplificação de algumas amostras de *Pantoea* empregadas nesse estudo é mostrado na Figura 1.

Amplicons de 361 pb ou 389 pb também foram observados em amostras de quatro linhagens de *P. allii* (Figura 1). Na última década, membros do gênero *Pantoea* isolados de cebola (*Allium cepa* L.) nos EUA e na África do Sul foram rotineiramente identificados como *P. ananatis*, tendo como base características bioquímicas (Gitaitis & Gay, 1997; Walcott *et al.*, 2002) e na análise de sequências do gene ribossomal 16S (Goszczyńska *et al.*, 2006). Recentemente, a análise MLSA (multilocus sequence analysis) e AFLP (amplified fragment length polymorphism) mostraram que o grupo EUA/África-do-Sul de *Pantoea* é formado por duas espécies diferentes, embora muito relacionadas: *P. ananatis*, e uma nova espécie que foi denominada de *P. allii* (BRADY *et al.*, 2011). Contudo, é necessário realizar o sequenciamento completo de pelo menos um dos isolados identificados como *P. allii* e proceder a análise comparativa com a sequência completa do genoma de *P. ananatis* para esclarecer a posição taxonômica e definir o *status* de *P. allii* como uma nova espécie ou como uma linhagem diferente de *P. ananatis*. Embora *P. allii* tenha sido descrita apenas nos EUA e na África do Sul, a identificação dessa nova espécie é muito recente (Brady *et al.*, 2011) e a gama de hospedeiros, bem como sua ocorrência em outras partes do mundo, precisa ser investigada. Além disso, a grande afinidade genética entre *P. allii* e *P. ananatis* aponta para a necessidade de revisão crítica da identidade de todos os isolados de *Pantoea*, anteriormente classificados como *P. ananatis*. No presente estudo, todos os isolados bacterianos de milho, sorgo e *Digitaria* sp. foram identificados como *P. ananatis* por meio de testes bioquímicos e de sequenciamento do gene 16S e da região ITS 16S-23S rRNA genes. A habilidade de *P. allii* produzir ácido usando amidalina ou adonitol como substratos é uma característica fenotípica usada para diferenciação inequívoca de *P. allii* e *P. ananatis* (BRADY *et al.*, 2011). A capacidade de fermentar adonitol foi testada para os isolados de bactérias utilizadas no presente estudo e para outros 56 isolados previamente identificados como *P. ananatis*. Os resultados foram negativos para *P. allii*, reforçando a identidade dos isolados bacterianos de milho, sorgo e *Digitaria* sp. como pertencentes à espécie *P. ananatis*.

Mesmo em cebola, os iniciadores ANAF e EC5-modificado também poderão ser

utilizados como um primeiro método para distinguir *P. allii* e *P. ananatis* de outras espécies de *Pantoea* e o teste bioquímico poderá ser usado para discriminar *P. allii* e *P. ananatis*.

Conclusão

Neste estudo ficou demonstrado que reações de PCR com os iniciadores ANAF e EC5-modificado representam poderosa ferramenta para identificação rápida e confiável de *P. ananatis* isolada de milho, sorgo e *Digitaria* sp. e constitui um teste simples, rápido e acurado para diagnóstico direto de *P. ananatis* associada com lesões MBM.

Agradecimentos

À FAPEMIG e EMBRAPA MILHO e SORGO pelo auxílio financeiro.

Literatura Citada

ALIPPI, A.M.; LÓPEZ, A.C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. *Plant Disease*, v. 94, p. 487, 2010.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v.25, p. 3389–3402, 1997.

BRADY, C.L.; GOSZCZYNSKA, T.; VENTER, S.N.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; GITAITIS, R.D.; COUTINHO, T. *Pantoea allii* sp. nov., isolated from onion plants and seed. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, p. 932-937, 2011.

BRADY, C.L. Taxonomy and relatedness of *Pantoea* strains recovered from Eucalyptus from South Africa, South America and Uganda. Ph.D. Thesis. University of Pretoria, Pretoria, Gauteng, South Africa, 2005.

COTA, L.V.; COSTA, R.V.; SILVA, D.D.; PARREIRA, D.F.; LANA, U.G.P.; CASELA, C.R. First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, v.5, p.120–122, 2010.

COUTINHO, T.; VENTER, S.N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, v. 10, p. 325–335, 2009.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990.

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

GONÇALVES, R.M.; PEDRO, E.S.; MEIRELLES, W.F.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.

Capim-colchão: hospedeiro alternativo de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010.

GOSZCZYNSKA, T.; MOLOTO, V.M.; VENTER, S.N.; COUTINHO, T.A. Isolation and identification of *Pantoea ananatis* from onion seed in south Africa. *Seed Science Technology*, v. 34, p. 655-668, 2006.

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

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, v. 9, p. 868-877, 1999.

KRAWCZYK, K.; KAMASA, J.; ZWOLINSKA, A.; POSPIESZNY, H. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. *Journal of Plant Pathology*, v. 92, p. 807-811, 2010.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; FERRERA, 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.

PÉREZ-Y-TERRÓN, R.; VILLEGAS, M.C.; CUELLAR, A.; MUÑOZ-ROJAS, J.; CASTAÑEDA-LUCIO, M.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; BAUTISTA-SOSA, L.; MUNIVE, J.A.; CAICEDO-RIVAS, R.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. *Australasian Plant Disease Notes*, v.4, p.96-99, 2009.

POMINI, A.M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; MARSALOLI, A.J. Acyl-Homoserine lactones produced by *Pantoea* sp. isolated from the “Maize White Spot” foliar disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.1200-1204, 2007.

SAWAZAKI, E.; DUDIENAS, C.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; GALVÃO, J.C.C.; CASTRO, J.L.; PEREIRA, J. Reação de cultivares de milho à mancha de *Phaeosphaeria* no estado de São Paulo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, p. 585-589, 1997.

WALCOTT, R.R.; GITAITIS, R.D.; CASTRO, A.C.; SANDERS, F.H.; DIAZ-PEREZ, J.C. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. *Plant Disease*, v.86, p. 106-111, 2002.

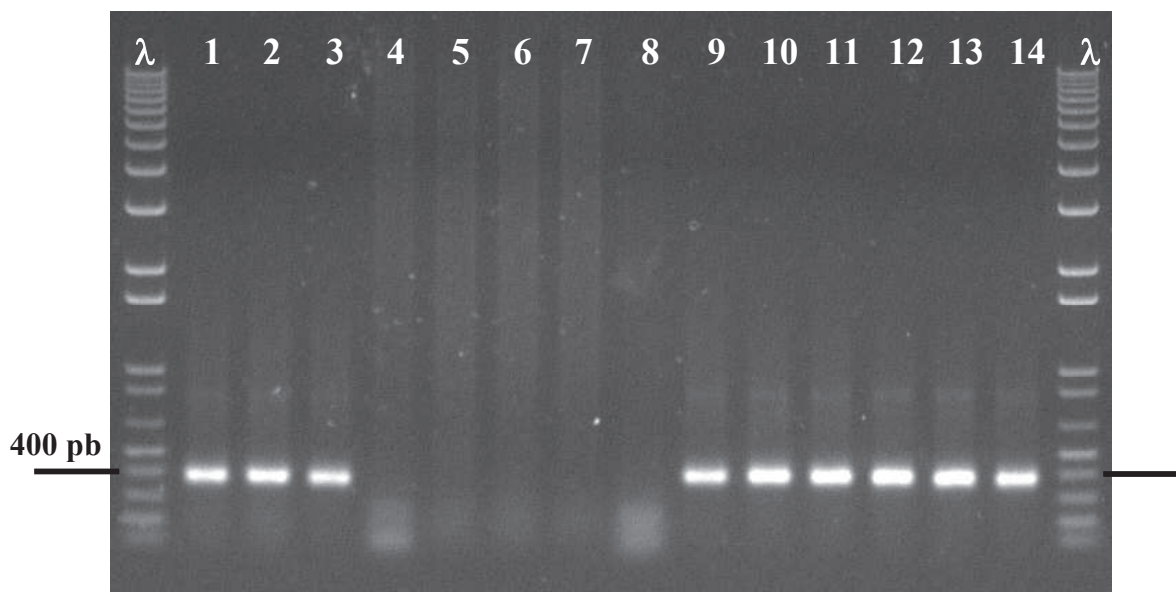


Figura 1. Gel de agarose dos produtos de PCR com amostras de DNA de diferentes fontes amplificados com os iniciadores ANAF e EC5-modificado. Linhas λ: 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); linhas 1-8: linhagens de referencia de *Pantoea* sp.; linhas 1 e 2: *P. ananatis* (PNA 08-2 e PNA 97-5); linha 3: *Pantoea allii* (BD390^T=LMG 24248^T); linhas 4 a 6: *P. agglomerans* (PNG 06-3, PNG 09-1 and PNG 97-2); linhas 7 e 8: *P. stewartii* (ES 02-1 and ES 02-2); linhas 9 a 11: DNA genômico de *P. ananatis* isolada de milho, sorgo e *Digitaria* sp., respectivamente; linhas 12 a 14: DNA genômico total extraído de pool de lesões MBM de milho, sorgo e *Digitaria* sp., respectivamente. Aliquotas de 5 µl das reações de PCR (linhas 1 a 3 e 9 a 14) e 15 µL (linhas 4 a 8).