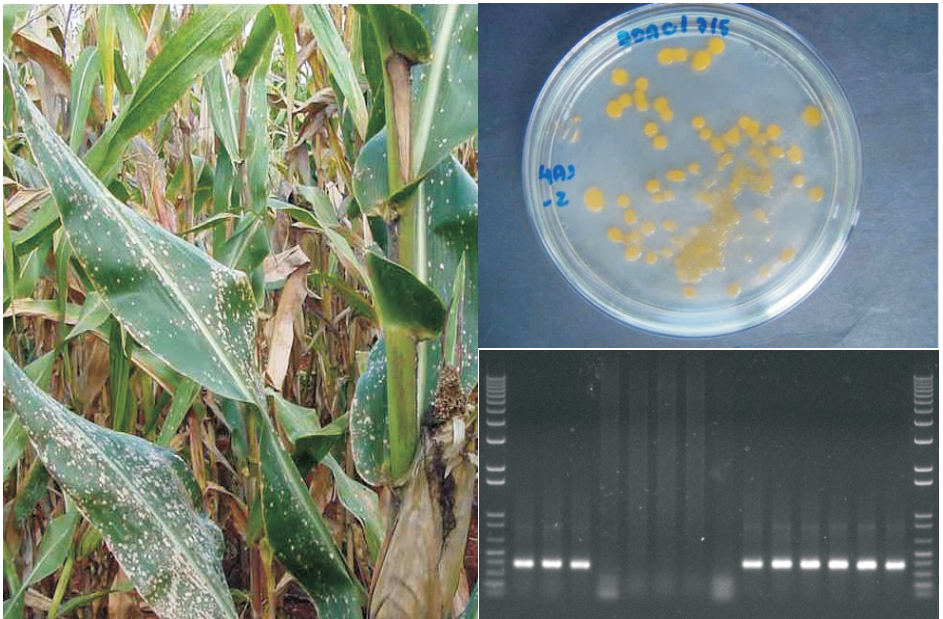


Diagnóstico Molecular de *Pantoea ananatis* em Milho, Sorgo e *Digitaria* sp



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 142

Diagnóstico Molecular de *Pantoea ananatis* em Milho, Sorgo e *Digitaria* sp

José Edson Fontes Figueiredo
Luzia Doretto Paccola-Meirelles

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Flávia Cristina dos Santos Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: José Edson Fontes Figueiredo e Luzia Doretto Paccola-Meirelles

1ª edição

1ª impressão (2012): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Figueiredo, José Edson Fontes.

Diagnóstico molecular de *Pantoea ananatis* em milho, sorgo e *Digitaria sp* / José Edson Fontes Figueiredo, Luzia Doretto Paccola-Meirelles -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2012.

19 p.: il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 142).

1. Bactéria. 2. Doença de planta. 3. Mancha branca. I. Paccola-Meirelles, Luzia Doretto. II. Título. III. Série.

CDD 632.32 (21. ed.)

© Embrapa 2012

Autores

José Edson Fontes Figueiredo

Biólogo, Doutor em Bioquímica, Pesquisador da
Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG
Jeff@cnpms.embrapa.br

Luzia Doretto Paccola-Meirelles

Bióloga, Doutora em Agronomia, Professora da
Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR
Paccola@uel.br

Apresentação

A doença conhecida como mancha-branca-do-milho (MWS), inicialmente descrita como mancha-de-phaeosphaeria (PLS), é uma das principais doenças do milho no Brasil e vem crescendo em importância para os produtos em diferentes países.

A identificação correta do agente etiológico é uma etapa importante para predição e manejo adequado da doença.

O fungo *Phaeosphaeria maydis* foi inicialmente descrito como o agente etiológico dessa doença (Rane et al., 1966).

Contudo, o insucesso na reprodução de sintomas, a ocorrência do fungo restrita a algumas áreas de cultivo do milho e sua ausência em áreas de elevada incidência da doença geraram sérias dúvidas sobre a etiologia da mesma.

Assim, a realização de estudos científicos detalhados possibilitaram a identificação correta do agente causal da doença como sendo a bactéria *Pantoea ananatis* (Paccola-Meirelles et al., 2001). A partir dessa data, a doença passou a ser denominada mancha-branca-do-milho.

O desenvolvimento de métodos diagnósticos simples, precisos e rápidos podem acelerar a tomada de decisões para controle da doença.

Nesse documento é apresentado um método de diagnóstico que apresenta as características descritas anteriormente e que consiste no uso de apenas um par de iniciadores (*primers*) para amplificar uma região do cromossomo bacteriano que constitui uma assinatura genômica da espécie *P. ananatis*.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino
Chefe Geral
Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

Introdução	9
Agradecimentos	16
Referências	17

Diagnóstico Molecular de *Pantoea ananatis* em Milho, Sorgo e *Digitaria* sp

José Edson Fontes Figueiredo
Luzia Doretto Paccola Meirelles

Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays* L.), superado apenas pelos Estados Unidos e pela China (FAO, 2009). A doença mancha branca do milho (MBM) é responsável pela redução de até 60% da produtividade dessa cultura e encontra-se distribuída em quase todas as regiões brasileiras (CASELA et al., 2006; 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), está se tornando sério problema para os produtores desse grão em vários países (ALIPPI; LÓPEZ, 2010; KRAWCZYK et al., 2010; PÉREZ-Y-TERRÓN et al., 2009). Em 2010, Cota e colaboradores descreveram, pela primeira vez, os sintomas da doença em sorgo (COTA et al., 2010).

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; VENTER, 2009). Como saprófita, *P. ananatis*, vivendo nos restos culturais, pode causar doenças mais cedo na cultura do milho. Além disso, essa bactéria pode ser isolada de *Digitaria horizontalis* e *D. insulares*, que são plantas invasoras

associadas à cultura do milho. 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. Além disso, esses métodos demandam muito tempo e requerem profissional com conhecimento especializado para realizar a difícil identificação dos isolados nas 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.

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 crescendo 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* 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 gentilmente fornecidos pelo patologista de plantas Dr. Ronald D. Gitaitis (University of Georgia, College of Agricultural &

Environmental Sciences, Tifton, GA, USA).

O DNA genômico das linhagens de referência das espécies: *P. vagans* (105^T= LMG 24199^T), *P. allii* (BD 390^T= LMG 24248^T), *P. anthophila* (689^T= LMG 2558^T), *P. eucalypti*, (76^T= LMG 24197^T), *P. deleyi* (BD767^T= LMG 24280^T), *P. rodasii* (518^T= LMG 26293^T), *P. rwandensis* (571^T= LMG 26275^T) e *P. wallisii* (682^T= LMG 26277^T) foram gentilmente fornecidos pela Dra. Teresa A. Coutinho (Department of Microbiology and Plant Pathology Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria, South Africa).

O 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; 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 da região ITS (*internal transcribed spacer*) dos genes rRNA 16S e 23S de *Pantoea* spp. depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e parecia com apenas uma das sete cópias de rDNA de *P. ananatis*, em uma região específica contendo um rearranjo genômico. O iniciador *Reverse* universal EC5: 5'-TGCCAGGGCATCCACCGTGACGCT-3' (GÜRTLER; STANISH, 1996) foi modificado pela adição de oito nucleotídeos (letras em destaque) na extremidade 3'. A espécie-especificidade dos *primers* foi previamente 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 (FIGUEIREDO et al., 2009), com 60 °C para a temperatura de pareamento e 0.5

unidade de Taq DNA Polymerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brazil). Alíquotas de 20 µL das reações de PCR foram resolvidos em géis de agarose a 0,8% (w/v), contendo 3 µl de brometo de etídio na concentração de 10 mg/mL, em tampão Tris-Acetate-EDTA (TAE), a 60 v por 90 minutos. Os amplicons foram cortados dos géis de agarose e 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 (Empresa, Local), em sequenciador ABI Prism 3100 Automatic Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências contíguas, geradas com o programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999), foram depositadas no GenBank e receberam os números de acesso JN622029 a JN622037 e JQ288776 a JQ288839.

A análise *in silico* 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 (DE MAAYER et al., 2010) e 388 pb para a linhagem AJ13355 (GenBank acesso AP012032.1, Hara & Ito 2010, resultados não publicados, submissão direta para o GenBank). Outros dois amplicons (3487 pb e 4643 pb) também foram previstos para a bactéria *Clostridium difficile*, uma espécie comensal do intestino humano e não associada com plantas (HARVEY et al., 2011).

Os produtos das reações de PCR com os iniciadores ANAF e EC5-modificado 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 o tamanho de 361 pb ou 389 pb, resultados muito similares à análise com Primer-BLAST (Tabela 1). O padrão eletroforético dos produtos de amplificação de algumas amostras de *Pantoea* spp. empregadas nesse estudo é mostrado na figura 1.

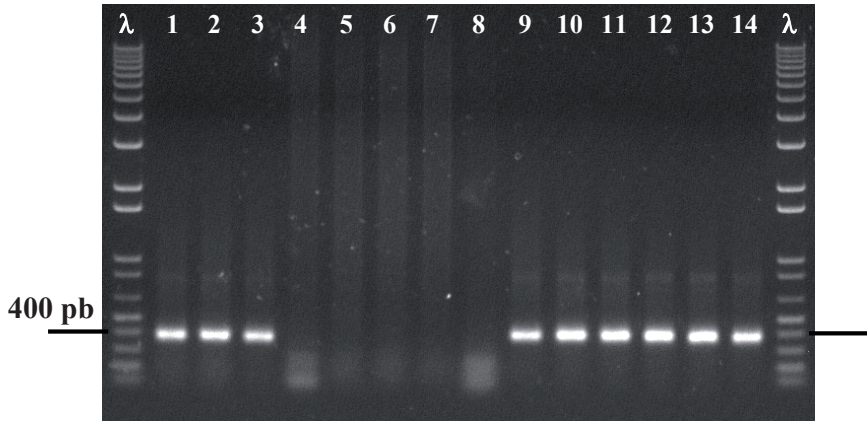


Figura 1. Gel de agarose dos produtos de PCR com amostras de DNA de diferentes fontes amplificados com os iniciadores ANAF e EC5-modificado. Linhas λ : 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); linhas 1-8: linhagens de referência de *Pantoea* spp.; linhas 1 e 2: *P. ananatis* (PNA 08-2 e PNA 97-5); linha 3: *P. 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. Alíquotas de 5 μ l das reações de PCR (linhas 1 a 3 e 9 a 14) e 15 μ L (linhas 4 a 8).

Tabela 1. Amplicons resultantes das reações de PCR com os iniciadores ANAF e EC5-modificado usando amostras de DNA de *P. ananatis* e *P. allii* isoladas de diferentes espécies de plantas e de diferentes regiões geográficas.

Linhagens e Isolados	Espécie	Hospedeiro/ fonte	País	Tamanho do Amplicon (bp)
PNA 97-1	<i>P. ananatis</i>	<i>Allium cepa</i> -----	US	389
PNA 99-13	<i>P. ananatis</i>	<i>Allium cepa</i> bulbos	US	389
PNA 200-5	<i>P. ananatis</i>	<i>Allium cepa</i> folhas	US	389
PNA 08-2	<i>P. ananatis</i>	<i>Allium cepa</i> bulbos	US	389
LMG 24248 ^T (BD390 ^T)	<i>P. allii</i>	<i>Allium cepa</i> britex	ZA	361
Bsf 24	<i>P. allii</i>	<i>Allium cepa</i> sementes	US	389
HH 24	<i>P. allii</i>	<i>Allium cepa</i> sementes	US	361
BD 380	<i>P. allii</i>	<i>Allium cepa</i> britex	ZA	361
PR234 to PR237, PR240 a PR246	<i>P. ananatis</i>	<i>Zea mays</i> epifítica	BR	389
PR238, PR239	<i>P. ananatis</i>	<i>Zea mays</i> epifítica	BR	361
PR258 to PR260, PR262, PR264	<i>P. ananatis</i>	<i>Zea mays</i> restos culturais	BR	389
PR257, PR261	<i>P. ananatis</i>	<i>Zea mays</i> restos culturais	BR	361
MS281, MS282, MS284, MG286, PR248, PR249, PR251 a PR254, PR 271, PR272, PR276, PR279, PR280	<i>P. ananatis</i>	<i>Zea mays</i> lesões MWS	BR	389

PR247, PR250, PR255, PR256, PR270, PR273 a PR275, PR277, PR278, PR283	<i>P. ananatis</i>	<i>Zea mays</i> lesões MWS	BR	361
----- -----	-----	<i>Zea mays</i> pool de lesões MWS	BR	389
PA10121, MG287, GO290	<i>P. ananatis</i>	<i>Sorghum</i> <i>bicolor</i> lesões "MWS"	BR	389
GO288, GO289, MG285, MG292 a MG297	<i>P. ananatis</i>	<i>Sorghum</i> <i>bicolor</i> lesões "MWS"	BR	361
----- -----	-----	<i>Sorghum</i> <i>bicolor</i> pool de lesões "MWS"	BR	389
PR265, PR266, MG302	<i>P. ananatis</i>	<i>Digitaria</i> sp. lesões "MWS"	BR	389
----- -----	-----	<i>Digitaria</i> sp. pool de lesões "MWS"	BR	389

US= Estados Unidos da America; ZA= Africa do Sul; BR= Brasil. GO (Goiás); MG (Minas Gerais; MS (Mato Grosso do Sul); PR (Paraná).

PA= Linhagem bacteriana de Minas Gerais. Pool de lesões 'MWS' e lesões "MWS" foram coletadas de plantas de milho e sorgo, nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Amplicons de 361 pb ou 389 pb também foram observados em amostras de quatro linhagens de *P. allii* (Tabela1). 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 análise de sequências do gene ribossomal 16S (GOSZCZYNSKA et al., 2006). Recentemente, as análises 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 por *P. allii* (BRADY et al., 2011). 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 com todos os isolados de bactérias utilizadas no presente estudo. Os resultados foram negativos para *P. allii*, reforçando a identidade dos isolados bacterianos de milho, sorgo e *Digitaria* sp. como pertencentes a espécie *P. ananatis*.

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* de *P. ananatis*.

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

Agradecimentos

Os autores são gratos aos Professores Ronald D. Gitaitis e Teresa A. Coutinho pelo fornecimento das amostras de DNA das espécies e das linhagens de referência de *Pantoea* spp. Os autores

são igualmente gratos ao Prof. Evanguedes Kalapothakis, da Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil, pela autorização de uso do equipamento de sequenciamento de DNA, e à Dra. Áurea Valadares Folgueras Flatschart pelos valiosos comentários e sugestões durante a preparação do manuscrito. Esse estudo foi financiado pela EMBRAPA, FUNARBE e FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA.

Referências

ALIPPI, A. M.; LÓPEZ, A. C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. **Plant Disease**, St. Paul, 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**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BRADY, C. L. **Taxonomy and relatedness of *Pantoea* strains recovered from *Eucalyptus* from South Africa, South America and Uganda**. 2005. Tese (Doutorado) - University of Pretoria, Pretoria, Gauteng, 2005.

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**, Reading, v. 61, p. 932-937, 2011.

CASELA, R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 83).

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.

COUTINHO, T.; PREISIG, O.; MERGAERT, J.; CNOCKAERT, M. C.; RIEDEL, K. H.; SWINGS, J.; WINGFIELD, M. J. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, p. 20-25, 2002.

DE MAAYER, P.; CHAN, W. Y.; VENTER, S. N.; THOTH, I. K.; BIRCH, P. R. J.; JOUBERT, F.; COUTINHO, T. The genome sequence of *Pantoea ananatis* LMG20103, the causative agent of *Eucalyptus* blight and dieback. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 192, p. 2936-3937, 2010.

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

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Food and Agricultural commodities production. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 25 fev. 2012.

FIGUEIREDO, J. E. F.; GOMES, E. A.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U.G. P.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 522-534, 2009.

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**, St. Paul, v. 81, p. 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**, Oxford, v. 21, p. 983-989, 2002.

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**, Zurich, 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**, Reading, v. 142, p. 3-16, 1996.

HARVEY, R. B.; NORMAN, K. N.; ANDREWS, K.; NORBY, B.; HUME, M. E.; SCANLAN, C. M.; HARDIN, M. D.; SCOTT, H. M..

Clostridium difficile in retail meat and processing plants in Texas.

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 23, p. 807-811, 2011.

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**, Berlin, 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.; MARSAIOLI, A. J. Acyl-Homoserine lactones produced by *Pantoea* sp. isolated from the "Maize White Spot" foliar disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, 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**, Brasília, 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**, St. Paul, v. 86, p. 106-111, 2002.

Embrapa

Milho e Sorgo



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA