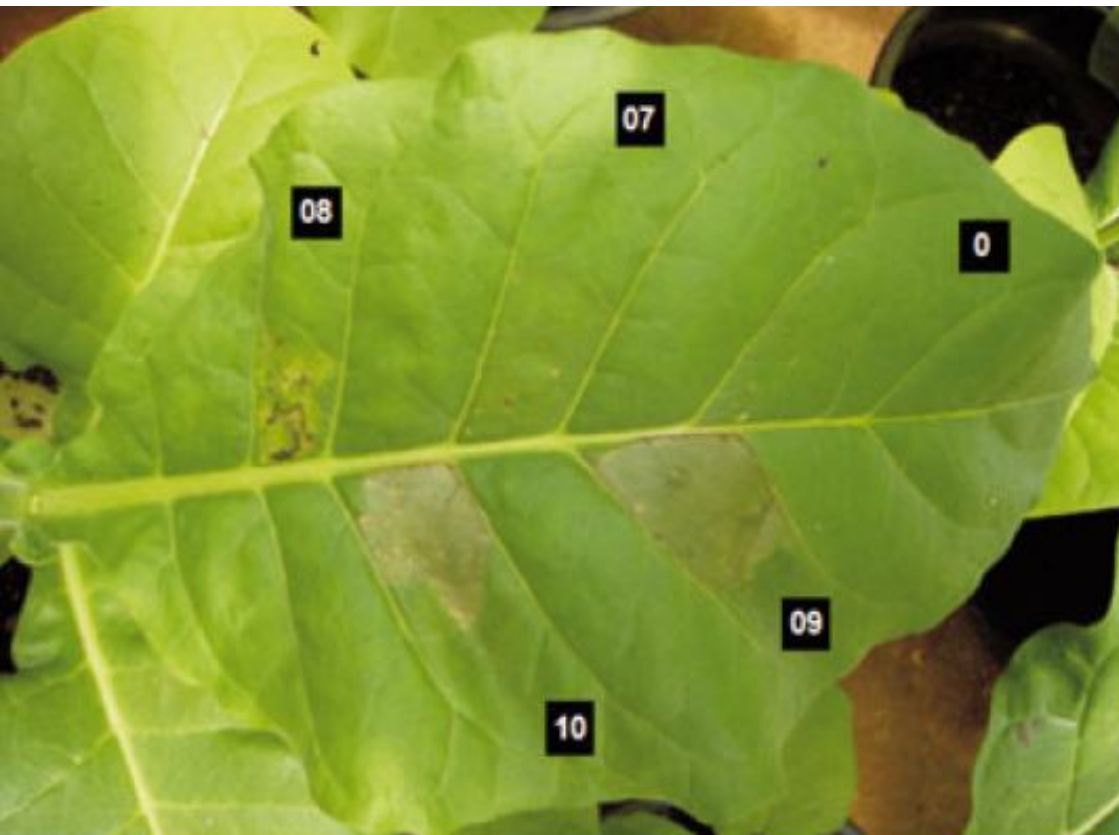


Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 61

ISSN 1679-0154
Dezembro, 2012

Detecção e Caracterização da Bactéria *Pantoea ananatis* Associada à Doença Mancha Branca em Milho, Sorgo e Capim-colchão



ISSN 1679-0154

Dezembro, 2012

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 61

Detecção e Caracterização da Bactéria *Pantoea ananatis* Associada à Doença Mancha Branca em Milho, Sorgo e Capim-colchão

Ubiraci Gomes de Paula Lana
Eliane Aparecida Gomes
Dagma Dionísia Silva
Rodrigo Veras Costa
Luciano Viana Cota
Jurandir Vieira de Magalhães
Claudia Teixeira Guimarães
Isabel Regina Prazeres de Souza

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2012

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:

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**

Deteção e caracterização da bactéria *Pantoea ananatis* associada à doença mancha branca em milho, sorgo e capim-colchão / Ubiraci Gomes de Paula Lana ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2012.
18 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 61).

1. Doença de planta. 2. Genética. I. Lana, Ubiraci Gomes de Paula. II. Série.

CDD 632.32 (21. ed.)

© Embrapa 2012

Sumário

Introdução	5
Material e Métodos	6
Resultados e Discussão	9
Referências	13

Detecção e Caracterização da Bactéria *Pantoea ananatis* Associada à Doença Mancha Branca em Milho, Sorgo e Capim-colchão

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Eliane Aparecida Gomes

Dagma Dionísia Silva

Rodrigo Veras Costa

Luciano Viana Cota

Jurandir Vieira de Magalhães

Claudia Teixeira Guimarães

Isabel Regina Prazeres de Souza

Introdução

Atualmente, a mancha branca é considerada uma das principais doenças foliares da cultura do milho no Brasil por causa da sua ampla distribuição e dos prejuízos que tem causado (COSTA et al., 2010). Em condições ambientais favoráveis, essa doença causa senescência das folhas e reduções no tamanho e peso dos grãos, resultando em perdas de produção de até 63% em genótipos susceptíveis (PINTO, 1995; PINTO et al., 1997). Os sintomas da doença apresentam-se na forma de lesões foliares aquosas que evoluem para lesões necróticas (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). O desenvolvimento de cultivares resistentes é considerado a estratégia mais eficiente na redução dos custos de produção e do impacto ambiental (SCHUELTER et al., 2003).

¹Químico, M.Sc. em Biologia Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br

²Bióloga, D.Sc. em Genética e Melhoramento, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, eliane.aparecida@embrapa.br

³Eng.-Agr., D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, dagma.silva@embrapa.br

⁴Eng.-Agr., D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, rodrigo.veras@embrapa.br

⁵Eng.-Agr., D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, luciano.cota@embrapa.br

⁶Eng.-Agr., Ph.D. em Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, jurandir.magalhaes@embrapa.br

⁷Eng.-Agr., D.Sc. em Melhoramento Genético Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, claudia.guimaraes@embrapa.br

⁸Eng.-Agr., D.Sc. em Melhoramento Genético Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, isabel.prazeres@embrapa.br

Inicialmente, a doença foi denominada mancha de *Phaeosphaeria*, sendo atribuída ao fungo *Phaeosphaeria maydis*, causador de estruturas filamentosas encontradas em lesões em estágio avançado da doença (FANTIN, 1994; CARSON, 1999). Entretanto, vários trabalhos realizados no Brasil (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; BOMFETI et al., 2008; LANZA, 2009; GONÇALVES, 2012), no México (PÉREZ-Y-TERRÓN et al., 2009), na Argentina (ALIPPI; LÓPEZ, 2010) e na Polônia (KRAWCZYK et al., 2010) identificaram e confirmaram a bactéria *Pantoea ananatis* como agente causal da mancha branca em milho.

P. ananatis é uma bactéria formadora de colônias amarelas, sendo uma das poucas espécies conhecidas que apresentam genes de nucleação por gelo (*ina*). Tais genes permitem a formação de cristais de gelo sob temperaturas desfavoráveis. (ABE et al., 1989). A bactéria *P. ananatis* também tem sido descrita como agente causal de doenças em várias outras espécies vegetais, incluindo arroz (COTHER et al., 2004), cebola (GITAITIS et al., 2002), eucalipto (COUTINHO et al., 2002), melão (KIDO et al., 2008) e sorgo (COTA et al., 2010). No entanto, a epidemiologia das doenças em plantas causadas por *P. ananatis* em diferentes hospedeiros é relativamente desconhecida, apesar de relatos da influência de fatores ambientais na severidade da doença (COUTINHO; VENTER, 2009).

Com o objetivo de avaliar a dinâmica da mancha branca, foi desenvolvido e validado um método rápido e de baixo custo para detecção molecular de *P. ananatis* isolada de lesões típicas da doença em milho e outros hospedeiros. Adicionalmente, isolados de *P. ananatis* foram caracterizados quanto à capacidade de desenvolver resposta de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco. Essas estratégias serão úteis em estudos epidemiológicos visando um melhor entendimento da doença.

Material e Métodos

Isolamento bacteriano

Lesões em estágio inicial da mancha branca foram coletadas em folhas de milho, sorgo e capim-colchão (*Digitaria spp.*) em áreas

produtoras na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG. As amostras foram lavadas com sabão neutro, as lesões, cortadas e tratadas com etanol 70% (v/v) durante 1 min, cloramina T 2% (m/v) durante 4 min e etanol 70% (v/v) durante 30 s. Em seguida, foram lavadas em água estéril por três vezes durante 30 s. As lesões foram fragmentadas com bisturi estéril e transferidas para meio de ágar tripticase soja (TSA) contendo ciclohexamina 50 µg/mL. Colônias bacterianas de cor amarela foram frequentemente observadas após 24 h de cultura a 28 °C. Após subcultura, 27 colônias isoladas de milho e duas colônias isoladas de sorgo e capim-colchão mostrando diferentes tonalidades amarelas foram selecionadas para análise molecular. Para armazenamento, as células bacterianas foram conservadas em glicerol 30% (v/v) e mantidas a -80 °C. O isolado de *P. ananatis* de sorgo foi o mesmo reportado por Cota et al. (2010), capaz de causar a doença mancha branca nessa cultura. A região do gene 16S rDNA desse isolado foi parcialmente sequenciada e depositada no GenBank (HQ333482), sendo considerado um isolado de referência.

PCR para detecção de *P. ananatis* associada à mancha branca

O DNA genômico foi extraído de acordo com Ausubel et al. (1987) a partir de células bacterianas na fase exponencial cultivadas em meio de caldo tripticase soja (TSB) crescidas a 28 °C durante 12 h.

Foi padronizada uma PCR multiplex com volume final de 20 µL contendo *primers* para o gene *ina* e para o gene 16S rDNA, utilizado como controle interno. Os *primers* para o gene *ina* foram INAF (GGG ATC GCA AGC AAG CTC TGG) e INAR (GCG ATT ATT CTT CGG GTT T), desenhados para a amplificação de *P. ananatis* de melão (KIDO et al., 2008). Os *primers* para amplificação da região do 16S rDNA foram 968F (GAA CGC GAA GAA CCT TAC) e 1492R (TGA CTG GAG ACT GYT ACC TTG TTA CGA CTT) (LANE, 1991; NUBEL et al., 1996). A reação de PCR foi realizada com 30 ng de DNA ou 1 µL da cultura de células bacterianas em caldo TSB (a mesma utilizada para a extração de DNA), Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, gelatina 0,001% (m/v), 0,5 µM de cada *primer*, dNTP 0,125 mM, 1,5 mM de MgCl₂, dimetil sulfoxido 5% (v/v) e 0,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições de

amplificação foram 95 °C durante 2 min, seguidos de 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s e 72 °C por 30 s, seguidos de uma etapa de alongação final a 72 °C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v).

Sequenciamento de DNA

A reação de PCR foi realizada num volume total de 50 µL, contendo 30 ng de DNA bacteriano, 1,5 unidades de Taq DNA polimerase, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, KCl 50 mM, gelatina 0,001% (m/v), dNTP 0,125 mM, formamida 1% (v/v) e 0,4 µM dos *primers* 968F ou 1401R (LANE, 1991; NUBEI et al., 1996). As condições de amplificação foram 94 °C durante 2 min, seguidos por 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C durante 1 min e 72 °C por 2 min. Por fim, uma etapa de extensão a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) conforme as condições do fabricante e sequenciados utilizando o kit Big Dye (Applied Biosystems), no equipamento ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). O programa BlastN (ALTSCHUL et al., 1997) foi utilizado para a busca de similaridade de seqüências em bases de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificação das espécies bacterianas. Para a confirmação da especificidade do fragmento resultante da amplificação do gene *ina*, seu produto foi removido do gel de agarose e sequenciado como descrito anteriormente.

Resposta de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco

Todas as bactérias isoladas a partir de lesões de mancha branca foram avaliadas quanto à capacidade de induzir HR em folhas de tabaco. Para isso, os isolados foram incubados individualmente a 37 °C durante 24 h em meio de caldo de peptona levedura (YP) [extrato de levedura 0,5% (m/v), peptona 1% (m/v), pH 6,8], com agitação a 120 rpm. A concentração de células bacterianas foi ajustada para 10⁹ UFC/mL antes da inoculação em folhas de tabaco completamente expandidas da variedade *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 com uma seringa hipodérmica. A agulha foi inserida na região internerval e uma área de aproximadamente 1

cm² foi inundada com a suspensão bacteriana. Um controle negativo contendo apenas meio YP foi incluído em cada folha. As plantas de tabaco foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura aproximada de 30 °C. Uma reação de HR positiva foi registrada quando o tecido inoculado apresentava colapso ou necrose dentro de 48 h após a inoculação. O isolado 09, que demonstrou reação positiva, foi incluído em todas as folhas inoculadas como controle. Cada inoculação foi repetida pelo menos três vezes para confirmação dos resultados.

Resultados e Discussão

A importância crescente da doença mancha branca do milho no Brasil tem estimulado estudos para detecção da bactéria *P. ananatis* em milho e outros hospedeiros. Em nosso trabalho, lesões típicas da mancha branca foram observadas em condições de campo em milho, sorgo e capim-colchão (Fig. 1a-c). Após o isolamento dos microrganismos dessas lesões, 29 isolados apresentando colônias com diferentes tonalidades amarelas foram selecionados para análise molecular (Figura 1d). Destes, 27 isolados foram de milho, um de sorgo e um de capim-colchão.

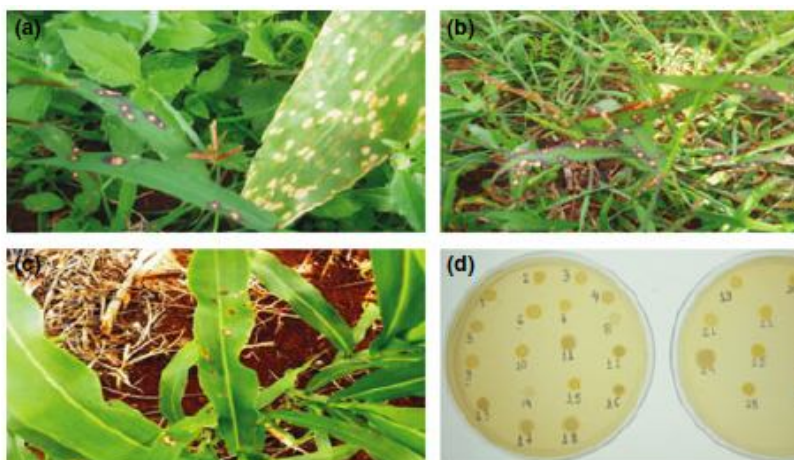


Figura 1. Gramíneas com sintomas semelhantes à doença mancha branca do milho e colônias de bactérias isoladas das lesões foliares. (a) Milho e capim-colchão. (b) Capim-colchão. (c) Sorgo. (d) Isolados bacterianos de lesões de mancha branca de milho (1-26 e 28), capim-colchão (27) e sorgo (29) em meio TSA.

Uma reação de PCR multiplex foi padronizada utilizando *primers* para o gene de nucleação de gelo (*ina*), combinado com *primers* para o gene 16S rDNA. Dos 29 isolados bacterianos de coloração amarela, 15 isolados, incluindo 13 de milho, um de sorgo e de um de capim-colchão, mostraram a presença do fragmento de 343 pb corresponde ao gene *ina*. Adicionalmente, todos os isolados amplificaram um fragmento de 524 pb corresponde ao gene 16S rDNA, confirmando sua eficácia como controle interno no PCR multiplex (Fig. 2). Os perfis de amplificação obtidos a partir de DNA purificado ou cultura celular foram semelhantes, sendo este último muito mais simples e rápido, permitindo a análise de um grande número de amostras (Fig. 2a, b). O produto de amplificação do gene *ina* do isolado 01 foi sequenciado e confirmado, mostrando uma identidade de sequência igual 99% com o gene *ina* de *P. ananatis* (GenBank, D14992.1).

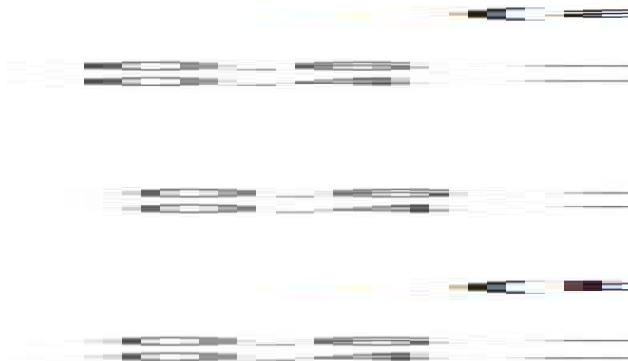


Figura 2. PCR multiplex mostrando os produtos de amplificação parcial dos genes *ina* (343 pb) e 16S rDNA (524 pb) para os isolados bacterianos de lesões de mancha branca em milho (1-26 e 28), capim-colchão (27) e sorgo (29). (a) Padrão de amplificação a partir da cultura de células bacterianas e (b) Padrão de amplificação do DNA purificado. As setas indicam os produtos de amplificação e MM corresponde ao marcador molecular 1 kb DNA ladder (Invitrogen).

Todos os isolados foram identificados pelo sequenciamento parcial da região 16S rDNA e apresentaram identidade de sequência

entre 95-99% com espécies bacterianas depositadas no GenBank (Tabela 1). Os 15 isolados positivos no PCR para o gene *ina* foram confirmados como *P. ananatis* (Fig. 2).

Tabela 1. Identificação de espécies baseada na identidade de sequência da região do 16S rDNA de isolados de bactérias de lesões de mancha branca em milho, sorgo e capim-colchão.

Isolado	Hospedeiro	Espécies	Acesso GenBank	E-value	Identidade (%)	Referência ^a	PCR <i>ina</i>	HR ^b
01	Milho	<i>Pantoea ananatis</i>	AB297969.1	0.0	96	Kido et al., 2008	+	ND
02	Milho	<i>Pseudomonas putida</i>	AY456706.1	0.0	97	Rezzonico et al., 2004	-	+
03	Milho	<i>P. ananatis</i>	CP001875.1	0.0	98	De Maayer et al., 2010	+	-
04	Milho	<i>P. ananatis</i>	GU324769.1	0.0	99	Yan et al., 2010	+	ND
05	Milho	<i>Pantoea dispersa</i>	FJ611865.1	0.0	99	Rezzonico et al., 2009	-	-
06	Milho	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	97	Kido et al., 2008	+	+
07	Milho	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	98	Kido et al., 2008	+	-
08	Milho	<i>Pantoea agglomerans</i>	FJ611809.1	0.0	99	Rezzonico et al., 2009	-	+
09	Milho	<i>P. ananatis</i>	FJ611814.1	0.0	99	Rezzonico et al., 2009	+	+
10	Milho	<i>P. ananatis</i>	CP001875.1	0.0	99	De Maayer et al., 2010	+	+
11	Milho	<i>Uncultured bacterium</i>	EU942007.1	0.0	99	Eltnus e Heil, 2009	-	+
12	Milho	<i>Acinetobacter baylyi</i>	AB60252.1	0.0	99	Yang et al., 2009	-	-
13	Milho	<i>A. baylyi</i>	EU604244.1	0.0	98	Chen et al., 2008	-	-
14	Milho	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AM905852.2	0.0	95	Mulet et al., 2008	-	-
15	Milho	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	99	Kido et al., 2008	+	-
16	Milho	<i>A. baylyi</i>	EU604244.1	0.0	99	Chen et al., 2008	-	-
17	Milho	<i>Uncultured bacterium</i>	AB460252.1	0.0	99	Ikeda et al., 2009	-	-
18	Milho	<i>Uncultured bacterium</i>	AB460252.1	0.0	99	Ikeda et al., 2009	-	-
19	Milho	<i>P. ananatis</i>	CP001875.1	0.0	99	De Maayer et al., 2010	+	+
20	Milho	<i>P. putida</i>	HMI192789.1	0.0	99		-	ND
21	Milho	<i>P. ananatis</i>	CP001875.1	0.0	98	De Maayer et al., 2010	+	+
22	Milho	<i>P. agglomerans</i>	FJ611807.1	0.0	99	Rezzonico et al., 2009	-	+
23	Milho	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	99	Kido et al., 2008	+	-
24	Milho	<i>Enterobacter</i> spp.	GQ478275.1	0.0	99	Collavino et al., 2010	-	+
25	Milho	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	99	Kido et al., 2008	+	+
26	Milho	<i>Uncultured bacterium</i>	DC32292.1	0.0	99	Moissl et al., 2007	-	-
27	Capim-colchão	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	99	Kido et al., 2008	+	-
28	Milho	<i>P. ananatis</i>	CP001875.1	0.0	99	De Maayer et al., 2010	+	-
29	Sorgo	<i>P. ananatis</i>	HQ333482.1	0.0	100	Cota et al., 2010	+	+

^a Baseada nas publicações reportadas na pesquisa no GenBank que foram utilizadas para identificação de cada espécie por comparação de sequência. ^b HR: Resposta de hipersensibilidade ND: Não determinado.

Como esperado, o critério de seleção das colônias baseado apenas na coloração amarela não foi suficiente para identificação de *P. ananatis*. Outras bactérias, como *P. agglomerans* (WARREN et al., 1986) e *Pseudomonas* ssp. (WARREN; COROTO, 1989), possuem genes de nucleação de gelo e foram negativas para o ensaio, sendo uma forte evidência da especificidade desta reação para detecção de *P. ananatis* em milho e outros hospedeiros. Além disso, a reação de PCR multiplex validada neste trabalho foi otimizada para cultura celular, que é uma maneira mais simples, rápida e barata para detecção de *P. ananatis* do que estratégias de sequenciamento de genes constitutivos propostas por Brady et al. (2008).

Nesse trabalho, a bactéria *P. ananatis* foi também detectada em lesões típicas da doença em sorgo e capim-colchão, confirmando a existência de possíveis hospedeiros alternativos para este patógeno. Capim-colchão tem sido relatada como uma das

plantas daninhas mais frequentemente encontradas em campos de produção de milho no Brasil (PASQUALETTO et al., 2001; DUARTE et al., 2007). Recentemente, verificou-se que *P. ananatis* isolada de capim-colchão foi capaz de induzir à doença mancha branca em milho (SILVA et al., 2010). Além disso, *P. ananatis* foi relatada como patogênica em sorgo por inoculação artificial (AZAD et al., 2000) e capaz de causar a doença mancha branca em sorgo em condições naturais de campo no Brasil (COTA et al., 2010). Assim, a presença dessa bactéria em sorgo e capim-colchão tem considerável importância epidemiológica e funciona como uma fonte de inóculo, dificultando a adoção de estratégias de controle nas áreas produtoras de milho.

Ensaio de hipersensibilidade em folhas de tabaco revelaram que a área infiltrada com suspensão bacteriana começou a entrar em colapso após 24 h, seguida de necrose dentro de 48 h (Fig. 3).

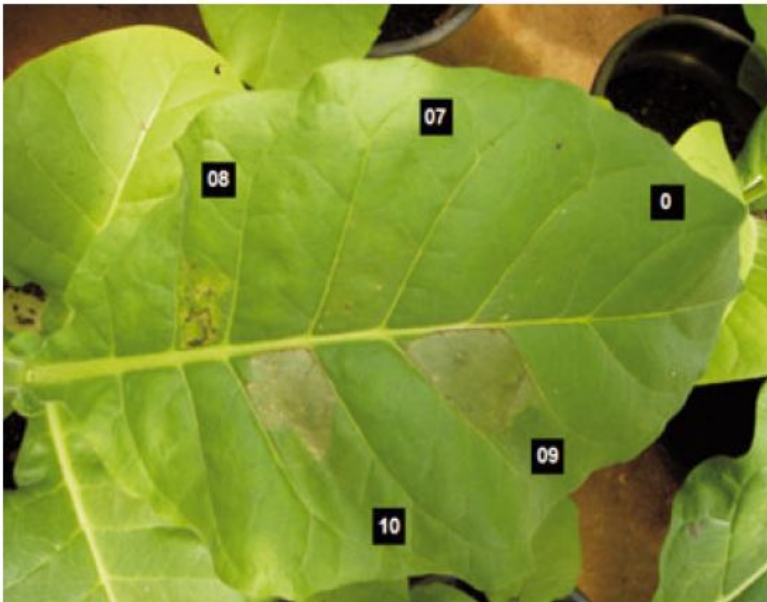


Figura 3. Reação de folha de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) após 48 h de infiltração com meio YB (0) e alguns isolados bacterianos (07, 08, 09, 10).

Dos 15 isolados de *P. ananatis* positivamente detectados pela reação de PCR, seis foram capazes de induzir HR (Tabela 1), em consonância com outros trabalhos (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; ALIPPI; LÓPEZ, 2010; KRAWCZYK et al., 2010). Por outro lado, sete isolados de *P. ananatis* não apresentaram sintomas após a inoculação, incluindo o isolado patogênico de sorgo (COTA et al., 2010). Uma resposta similar foi demonstrada por isolados patogênicos de melão (KIDO et al., 2010), sugerindo que somente os testes de infiltração de tabaco são insuficientes para determinação da patogenicidade de *P. ananatis*.

Resultados preliminares obtidos pela equipe de fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo têm demonstrado um aumento da eficiência de inoculação de *P. ananatis* em milho a partir de isolados positivos no ensaio com o PCR multiplex e nos testes de patogenicidade em folhas de tabaco.

Referências

- ABE, K.; WATABE, S.; EMORI, Y.; WATANABE, M.; ARAI, S. An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: Sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 258, p. 297-300, 1989.
- ALIPPI, A. M.; LÓPEZ, A. C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 487, 2010.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SIDEMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1987.

AZAD, H. R.; HOLMES, G. J.; COOKSEY, D. A. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 973-979, 2000.

BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACOLLA, E. A.; MASSOLA, N. S.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot diseases using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 63-66, 2008.

BRADY, C.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S. N.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; COUTINHO, T. A. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 31, p. 447-460, 2008.

CARSON, M. L. Vulnerability of U.S. maize germoplasm to *Phaeosphaeria* leaf spot. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 462-464, 1999.

CHEN, T. L.; SIU, L. K.; LEE, Y. T.; CHEN, C. P.; HUANG, L. Y.; WU, R. C.; CHO, W. L.; FUNG, C. P. New insight of *Acinetobacter baylyi* as a pathogen for opportunistic infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, p. 2938-2944, 2008.

COLLAVINO, M.; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A.; AGUILAR, O. M. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 727-738, 2010.

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.

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Doenças. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 1).

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

COUTINHO, T. A.; 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**, Saint Paul, v. 86, p. 20-25, 2002.

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

DE MAAYER, P.; CHAN, W. Y.; VENTER, S. N.; TOTH, I. K.; BIRCH, P. R. J.; JOUBERT, F.; COUTINHO, T. A. Genome sequence of *Pantoea ananatis* LMG20103, the causative agent of Eucalyptus blight and dieback. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 192, p. 2936-2937, 2010.

DUARTE, A. P.; SILVA, A. C.; DEUBER, R. Plantas infestantes em lavouras de milho safrinha, sob diferentes manejos, no Médio Paranapanema. **Planta Daninha**, Campinas, v. 25, p. 285-291, 2007.

EILMUS, S.; HEIL, M. Bacterial associates of arboreal ants and their putative functions in an obligate ant-plant mutualism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 4324-4332, 2009.

FANTIN, G. M. Mancha de Phaeosphaeria, doença do milho que vem aumentando sua importância. **Biológico**, São Paulo, v. 56, p. 39, 1994.

GITAITIS, R. D.; 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**, Surrey, v. 21, p. 983-989, 2002.

GONÇALVES, R. M. **Estudos etiológicos da mancha branca do milho e identificação de hospedeiros alternativos de *P.***

ananatis. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

IKEDA, S.; KANEKO, T.; OKUBO, T.; RALLOS, L. E.; EDA, S.; MITSUI, H.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; MINAMISAWA, K. Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 703-714, 2009.

KIDO, K.; ADACHI, R.; HASEGAWA, M.; YANO, K.; HIKICHI, Y.; TAKEUCHI, S.; ATSUCHI, T.; TAKIKAWA, Y. Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, p. 302-312, 2008.

KIDO, K.; HASEGAWA, M.; MATSUMOTO, H.; KOBAYASHI, M.; TAKIKAWA, Y.; *Pantoea ananatis* strains are differentiated into three groups based on reactions of tobacco and welsh onion and on genetic characteristics. **Journal of General Plant Pathology**, v. 76, p. 208-218, 2010.

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.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-175.

LANZA, F. E. **Mancha branca do milho**: etiologia e resistência de genótipos. 2009. 32 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MOISSEL, C.; OSMAN, S.; LA DUC, M. T.; DEKAS, A.; BRODIE, E.; DESANTIS, T.; VENKATESWARAN, K. Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled. **FEMS Microbiology and Ecology**, Haren, v. 61, p. 509-521, 2007.

MULET, M.; GOMILA, M.; GRUFFAZ, C.; MEYER, J. M.;

PALLERONI, N. J.; LALUCAT, J.; GARCIA-VALDES, E. Phylogenetic analysis and siderotyping as useful tools in the taxonomy of *Pseudomonas stutzeri*: description of a novel genomovar.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 58, p. 2309-2315, 2008.

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis.

Journal of Bacteriology, Washington, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

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 Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 275-279, 2001.

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**, Goiânia, v. 31, p. 133-138, 2001.

PÉREZ-Y-TERRÓN, A.; VILLEGAS, M. C.; CUELLAR, A. B. C.; 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.

PINTO, N. F. J. A. Produção de picnídios de *Phyllosticta* sp. "in vivo" e "in vitro" em folhas de milho tratadas com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 333, 1995.

PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Milho (*Zea mays* L.): controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. p. 821-864.

REZZONICO, F.; DEFAGO, G.; MOENNE-LOCCOZ, Y. Comparison of ATPase-encoding type III secretion system hrcN genes in

biocontrol fluorescent Pseudomonads and in phytopathogenic proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5119-5131, 2004.

REZZONICO, F.; SMITS, T. H.; MONTESINOS, E.; FREY, J. E.; DUFFY, B. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 204, 2009.

SCHUELTER, A. R.; SOUZA, I. R. P.; TAVARES, F. F.; SANTOS, M. X.; OLIVEIRA, E.; GUIMARÃES, C. T. Controle genético da resistência do milho à mancha por *Phaeosphaeria*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 2, p. 80-86, 2003.

SILVA, D. D.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; LANA, U. G. P.; FERREIRA, P.; NOLASCO, A. A. R.; SOUZA, I. R. P.; MARRIEL, I. E. Inoculação cruzada de isolados de *Pantoea ananatis* de milho e capim-colchão. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. 127, ago. 2010. Suplemento. Edição dos resumos do 18º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2010. Cuiabá.

WARREN, G. J.; COROTTO, L.; WOLBER, P. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 14, p. 8047-8060, 1986.

WARREN, G. J.; COROTTO, L. The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Pseudomonas syringae*. **Gene**, Amsterdam, v. 85, p. 292-294, 1989.

YAN, H.; YU, S. H.; XIE, G. L.; FANG, W.; SU, T.; LI, B. Grain discoloration of rice caused by *Pantoea ananatis* (synonym *Erwinia uredovora*) in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 482, 2010.

YANG, J. H.; LIU, H. X.; ZHU, G. M.; PAN, Y. L.; XU, L. P.; GUO, J. H. Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 91-104, 2008.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

