

Atividade de nucleação de gelo na patogenicidade de *Pantoea ananatis*, agente causal da Mancha Branca do Milho

A.V. Sauer¹, V. Y. Baba¹, E. S. Pedro¹, W. F. Meirelles², C. G. T. J. Andrade² e L. 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: INA, Patogenicidade, Ice nucleation

A Mancha Branca do Milho se destaca por sua alta incidência e severidade com que tem se manifestado a campo (Fernandes e Oliveira, 2000). A redução da taxa fotossintética ocorre não apenas no tecido lesionado, mas também em partes de tecidos verdes remanescentes de folhas infectadas (Godoy *et al.*, 2001). Seus sintomas surgem pelo aparecimento de lesões foliares aquosas do tipo anasarca, de coloração verde-escuro que posteriormente tornam-se necróticas de cor palha (Fernandes e Oliveira, 2000). Uma bactéria formadora de colônias mucóides de coloração amarelo brilhante, não esporulante, Gram negativa, anaeróbia facultativa, identificada como *Pantoea ananatis*, foi descrita como sendo o agente causal da doença (Paccola-Meirelles *et al.*, 2001). Segundo Pomini *et al.* (2006), esta bactéria é portadora de um mecanismo conhecido como “quorum-sensing”, o qual permite o reconhecimento do tamanho populacional através da secreção de substâncias como as acyl homoserina lactonas (Rumjanek *et al.*, 2004). Este mecanismo pode estar associado com a patogenicidade de *P. ananatis* (Morohoshi *et al.*, 2007). O fenótipo de nucleação de gelo é descrito como importante na virulência de bactérias fitopatogênicas e é controlado pelo gene *ina* (Edwards *et al.*, 1994) e muitas plantas são incapazes de suportar a formação de gelo em seus espaços intercelulares, causando o fenômeno conhecido por mancha anasarca (Romeiro, 2001). O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de nucleação de gelo de isolados obtidos de lesões anasarcas da Mancha Branca do Milho e verificar a relação deste fenótipo com a patogenicidade do agente causal.

Materiais e Métodos

1. Obtenção de isolados de *P. ananatis*

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

2. 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 por aproximadamente 2 minutos, à -10°C. A formação de gelo instantânea no tubo ao acrescentar a suspensão bacteriana, revelou o fenótipo INA positivo do isolado. Foram submetidos a esse teste 14 isolados de *P. ananatis*, obtidos de lesões da Mancha Branca do Milho. O controle consistiu na adição de meio TSB livre de bactéria nos tubos contendo água destilada esterilizada.



3. Microscopia eletrônica de transmissão

Os isolados WT2 e WT11 de *P. ananatis* foram cultivados em meio TSB (controle) e em meio TSB acrescido de 2,5% de glicerol (v/v) por um período de 12 horas a 30°C, sob agitação constante de 60 RPM. Em seguida, o meio foi centrifugado a 13000 RPM por 15 minutos, para se obter células isoladas do meio de cultura. As células foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) a temperatura ambiente por 12 horas. O material foi lavado em tampão cacodilato 0,1M, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas a temperatura ambiente e novamente lavado no mesmo tampão. As amostras foram desidratadas em séries de etanol com concentrações crescentes, embebidas e emblocadas em resina Araldite®. Cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos em ultramicrotomo (Ultracut – Leica) com navalha de diamante (Diatome 2 mm e 45°). Os cortes foram montados em telas de 200 mesh e contrastados em acetato de uranila (2%) e citrato de chumbo (Solução de Reynolds). As telas foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (Fei Tecnai 12) no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina (PPG/UEL).

4. Testes de patogenicidade

a. *Teste de patogenicidade em casa de vegetação*

Os testes de patogenicidade foram realizados no cultivar de milho suscetível DAS 657 em plantas com aproximadamente 35 dias de idade. Os isolados bacterianos utilizados foram WT2, WT7 E WT11. A unidade experimental utilizada foram vasos em triplicata, cada vaso contendo três plantas de milho. Um pré-inóculo foi preparado cultivando-se cada isolado em meio TSB por 12 horas a 30° C à 60 RPM. Após este período 1,0 mL do pré inóculo foi transferido para 100 mL de meio TSB e incubado nas condições anteriores por 4 horas (inóculo). Antes da inoculação, a cultura bacteriana foi acrescida de solução salina (0,85%) na proporção de 1:1 e permaneceu a uma temperatura de 4°C durante 2 horas. As folhas foram injuriadas suavemente com esponja do tipo “lava-louças” e imediatamente pulverizadas com a suspensão bacteriana. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 horas. Como controle utilizou-se apenas o meio TSB também diluído em solução salina na proporção de 1:1. O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados foram transformados para raiz quadrada de $(x+0,5)$ devido a presença de valores nulos.

b. *Teste de patogenicidade em laboratório*

Os testes de patogenicidade no laboratório foram realizados com folhas destacadas do cultivar de milho suscetível DAS 657 de plantas com aproximadamente 35 dias de idade. Os isolados bacterianos utilizados foram WT2, WT7 E WT11. As folhas foram destacadas, lavadas, injuriadas com esponja e acondicionadas em câmaras de microumididade (CM), contendo 12 poços de 0,3 cm de diâmetro, conforme descrito por Wysmierski *et al.* (2006). A área foliar correspondente a cada poço recebeu cinco furos com agulha de 2mm de diâmetro. O inóculo foi preparado conforme descrito anteriormente. As inoculações foram feitas com micropipetas. Como controle utilizou-se apenas o meio TSB também diluído em solução salina na proporção de 1:1. Após as inoculações o material foi acondicionado em câmara úmida por 72 horas. Foram utilizadas três repetições por tratamento, e o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Houve necessidade de transformação dos dados para raiz quadrada de $(x+0,5)$, visto que havia a presença de valores nulos.



Resultados e Discussão

Determinação da atividade de nucleação de gelo dos isolados bacterianos

Dos isolados obtidos de lesões anasarcas da Mancha Branca do Milho, 14 foram selecionados ao acaso e foram caracterizados para atividade de nucleação de gelo. Nove destes isolados apresentaram fenótipo INA⁺, demonstrando que a atividade de nucleação de gelo é dependente do isolado e de suas características genotípicas. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Escanferla (2005), Wysmierski *et al.*(2005) e Escanferla *et al.* (2006) em isolados de *P. ananatis* também obtidos de lesões da Mancha Branca do milho. Várias espécies de bactérias são capazes de catalizar a formação de gelo em temperaturas que normalmente isto não ocorreria. Estes microrganismos catalizam de forma eficiente a formação do gelo em temperaturas muito mais altas que muitas substâncias orgânicas ou inorgânicas (Lindow *et al.*, 1982 b; Gurian-Sherman e Lindow, 1993). A atividade de nucleação de gelo está fortemente correlacionada com a capacidade de estimular a ocorrência de doença por quedas de temperatura, sendo uma das propriedades necessária para ocasionar danos às plantas (Lindow *et al.*, 1982 a). Os danos às plantas ocorrem devido a formação de gelo nos espaços intercelulares em temperaturas onde este fenômeno normalmente não ocorreria (Lindow *et al.*, 1982 b; Lindow, 1987). De acordo com Edwards *et al.*, (1994) o fenótipo INA⁺ desempenha um importante papel na virulência das espécies portadoras. Moléculas de proteínas e materiais localizados na membrana externa de algumas espécies bacterianas foram consideradas por Kawahara (2002) como sendo as responsáveis pela nucleação de gelo. Substâncias nucleantes de gelo podem estar relacionadas a fosfolipídios e a outros fatores ligados a proteínas (Romeiro, 2001).

Os isolados WT2 e WT11 apresentando fenótipo INA⁺ foram selecionados para observação em microscopia eletrônica de transmissão. Sobre a parede celular, foram observadas estruturas arredondadas suportadas por um pedúnculo (Figura 1), semelhantes às descritas em outras espécies bacterianas por Phelps *et al.*, 1986; Kawahara, 2002. Estas estruturas, caracterizadas por estes autores como vesículas protéicas, seriam as responsáveis pela liberação dos núcleos de gelo. As vesículas observadas no presente trabalho não mostraram diferenças estruturais quando as células foram cultivadas em meio NB ou em meio NB acrescido de glicerol, porém, neste último, elas apresentaram-se em maior quantidade. A função e estrutura destas proteínas ainda têm sido pouco exploradas, dificultando a caracterização de bactérias que expressam este fenótipo (Kawahara, 2002).

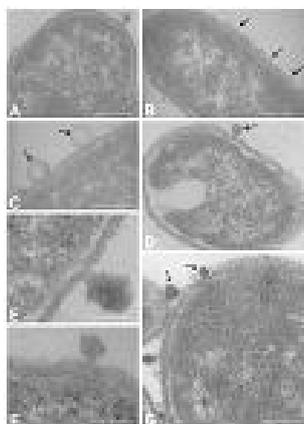


Figura 1. Células de *Pantoea ananatis*, isolada de lesões anasarcas da Mancha Branca do Milho, mostrando a presença de vesículas protéicas responsáveis pela liberação de núcleos de gelo (setas). (A) Isolado WT2 – cultivado em meio NB, mostrando a formação de uma única vesícula na região apical da célula. (B) e (C) Isolado WT2 – cultivado em meio NB + Glicerol, observar o aumento no numero de vesículas (setas) em relação ao controle. (D) e (E) WT11 – controle com presença de apenas uma vesícula. (F) e (G) WT11 – em meio NB + Glicerol notar o aumento no número de vesículas (setas) quando comparado com o controle. As vesículas tanto em glicerol quanto o controle apresentam as mesmas características ultraestruturais. (A), (B), (C), (D) e (G) Aumento 97.000X e barra de 200nm. (E) e (F) aumento de 235.000X e barra de 100nm

Testes de patogenicidade

Foram selecionados para este experimento os isolados WT2, WT7 e WT11 caracterizados anteriormente como positivos para atividade de nucleação de gelo. Em ambos os métodos, os sintomas passaram a ser observados no sétimo dia após a inoculação do patógeno nas folhas saudáveis (Figuras 2 e 3). Em casa de vegetação, o isolado WT7 apresentou a maior média de número de lesões. As avaliações feitas no nono dia após a inoculação permitiram observar lesões anasarcas e necróticas nas folhas inoculadas com este isolado. O controle diferiu estatisticamente dos tratamentos, não apresentando manifestação dos sintomas. Na inoculação em folhas destacadas em câmaras de microumididade, todos os isolados manifestaram sintomas, porém a semelhança da inoculação em vasos, a expressão dos sintomas foi mais pronunciada também no isolado WT7, o qual apresentou a maior média do número de lesões (Tabela 1). O controle não mostrou sintomas. Os resultados obtidos corroboram com Lindow *et al.* (1982 b), demonstrando a estreita ligação entre atividade de nucleação de gelo e patogenicidade. A presença de populações de bactérias INA⁺ sobre as folhas de plantas de milho em uma dada temperatura, é um dos fatores responsável pelos extensos prejuízos causados às plantas durante geadas (Lindow *et al.*, 1982 b). A habilidade de algumas plantas em abrigar grandes populações epifíticas de bactérias INA⁺ favorece o desencadeamento de sintomas por esta classe de organismos. O aumento da população bacteriana epifítica com atividade de nucleação de gelo ativa, implica no progresso do grau de danos à uma dada temperatura (Lindow, 1983). Segundo Rocha (2009) Isolados INA⁻ de *P. ananatis* extraídos das lesões da Mancha Branca do milho não foram capazes de causar lesão quando inoculados tanto a campo como em câmaras de microumididade.



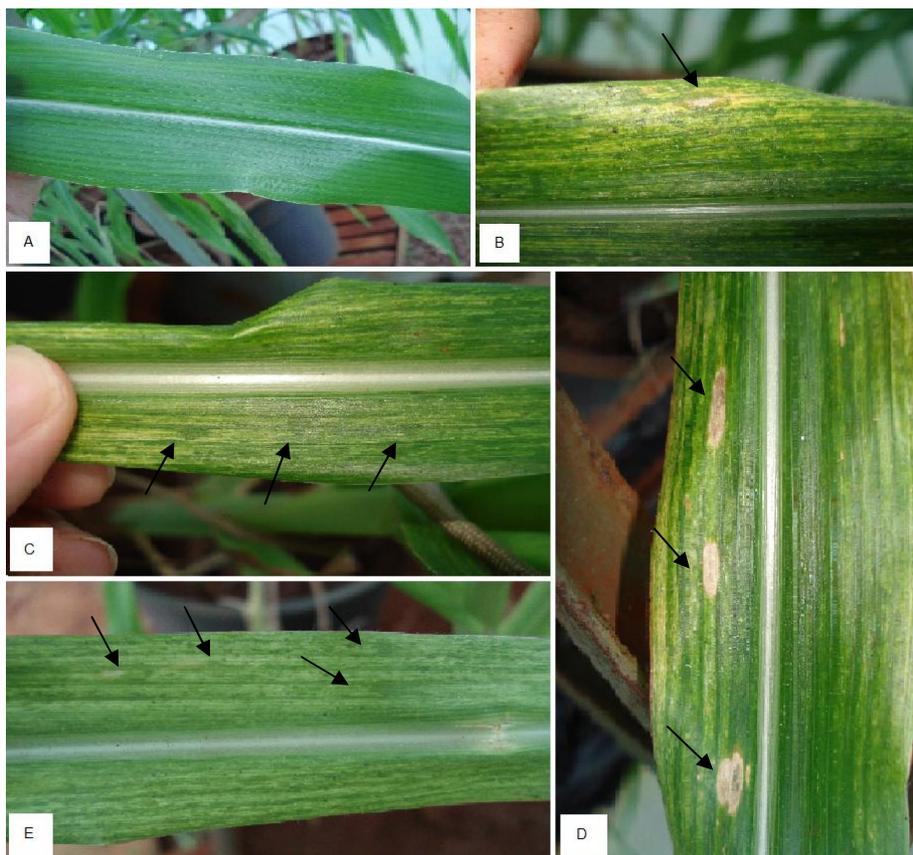


Figura 2 - Inoculação artificial de *Pantoea ananatis* na cultura do milho em casa de vegetação. (A) Controle. (B) Isolado WT2. (C) e (D) Isolado WT7. (E) Isolado WT11.

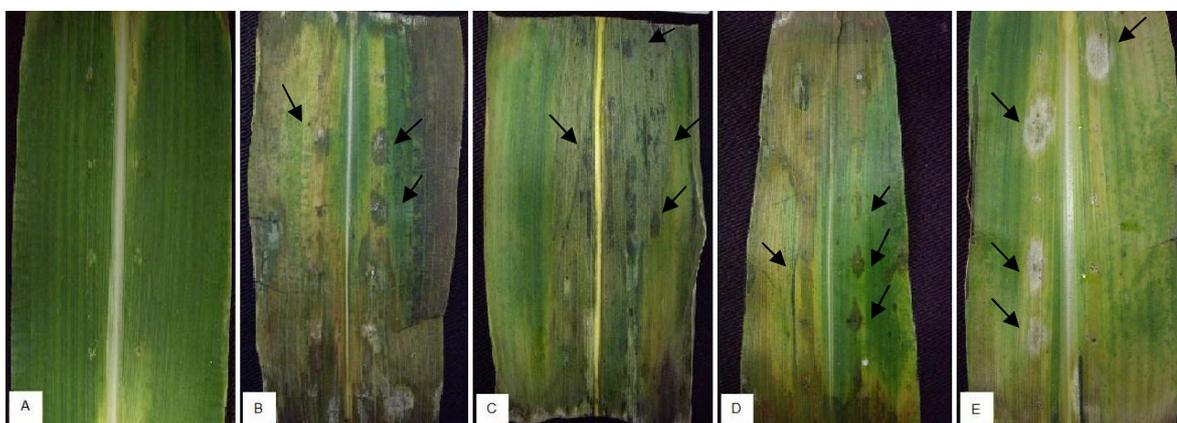


Figura 2 - Inoculação artificial de *Pantoea ananatis* em câmaras de microumidade em folhas de milho com 35 dias após a semeadura. (A) Controle. (B) Isolado WT2. (C) Isolado WT7. (D) e (E) Isolado WT11.



Tabela 1 - Número de lesões observados no teste de patogenicidade em casa de vegetação e em câmaras de microumidade. (Para as análises estatísticas dados foram transformados em raiz quadrada de $x+0,5$).

Isolados	Casa de vegetação	Câmara de microumidade
	Lesões*	
WT 2	2,60 ab	3,00 b
WT 7	4,40 a	8,67 a
WT 11	3,70 ab	4,33 b
Controle	0 b	0 c
CV%	59,45	10,6

*Média dos números de lesões obtidos através de inoculações artificiais (Dados originais). Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Os resultados demonstraram a presença de estruturas na parede de *P. ananatis* semelhantes a estrutura já descrita por outros autores como sendo responsáveis pelo fenômeno de nucleação de gelo. Parece haver uma relação entre a ocorrência desse fenômeno e a patogenicidade de *P. ananatis* em folhas de milho

Referências bibliográficas

EDWARDS, A. R.; VAN den BUSSCHET, WICHMAN, H. A.; ORSER, C. S. Unusual Pattern of Bacterial Ice Nucleation Gene Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 11, p. 911-920, 1994.

ESCANFERLA, M. E. **Avaliação das condições de crescimento e fatores que propiciam a disseminação da bactéria *P. ananas* no ambiente**. 2005. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Principais doenças na cultura do milho. **Circular técnica Embrapa**, Sete Lagoas, v. 2, p. 80, 2000.

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 209-215, 2001.



GURIAN-SHERMAN, D.; LINDOW, S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 7, p. 1338-1343, 1993.

KAWAHARA, H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, p. 492-496, 2002.

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**, Washington, v. 70, p. 1090-1093, 1982a.

LINDOW, S. E.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. Bacterial Ice Nucleation: A Factor in Frost Injury to Plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 70, p. 1084-1089, 1982b.

LINDOW, S.E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 21, p. 363-384, 1983.

LINDOW, S.E. Competitive Exclusion of Epiphytic Bacteria by Ice-Pseudomonas syringae Mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 2520-2527, 1987.

MOROHOSHI, T.; NAKAMURA, Y.; YAMAZAKI, G.; SHIDA, A.; KATO, N.; IKEDA, T. The Plant Pathogen *Pantoea ananatis* Produces *N*-Acylhomoserine Lactone and Causes Center Rot Disease of Onion by Quorum Sensing. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, p. 8333-8338, 2007.

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.

PHELPS, P.; GIDDINGS, T. H.; PROCHODA, M.; FALL, R. Release of cell-free ice nuclei by *Erwinia herbicola*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 167, p. 496-502, 1986.

POMINI, A. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MARSAIOLI, A. J. Estudo químico das substâncias sinalizadoras produzidas pela bactéria *Pantoea agglomerans*, isolada da doença da pinta branca do milho. In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 29, 2006b, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia**, 2006. CD ROM.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV. 279p. 2001.

ROCHA, K. R. **Perfil genético de *Pantoea ananatis* agente causal da doença Mancha Branca do Milho e fatores envolvidos no desenvolvimento da doença**. 2009. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 35-50, 2004.

WYSMIERSKI, P. T.; ESCANFERLA, M. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Atividade de nucleação de gelo e produção de exoenzimas em *Pantoea ananatis*, agente causal da Pinta Branca do Milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 57, 2005.



WYSMIERSKI, P. T.; REAL, K ;PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *Pantoea ananatis*: Monitoramento da população epifítica sobre folhas de milho e avaliação de métodos artificiais de inoculação. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26, 2006; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 2; SIMPÓSIO SOBRE *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA*, 1. Belo Horizonte, 2006. **Anais....** Belo Horizonte, 2006. p. 1-5.

