

Caracterização comparativa entre isolados de *Pantoea ananatis* oriundos de lesões de capim-colchão com aqueles de lesões da Mancha Branca do Milho

Katia R. Rocha¹, Gisele M. Andrade-Nobrega¹, José Edson. F. Figueiredo², Ivanildo E. Marriel², Walter F. Meirelles² e Luzia D. Paccola-Meirelles¹.

¹UEL, CP 6001, 86051-990, Londrina, PR. ²Embrapa Milho e Sorgo, CP 285, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brasil. *E-mail* : katia2_real@yahoo.com.br.

Palavras-chave: nucleação do gelo; *Zea mays*; RAPD; seqüenciamento

A Mancha Branca do Milho (MBM) é uma doença foliar cujo agente etiológico é a bactéria *Pantoea ananatis* (Paccola-Meirelles, *et al.*, 2001; Bomfeti, *et al.*, 2008). Esta bactéria apresenta a capacidade de produzir o fenômeno de “ice nucleation” (INA), que consiste na formação de gelo em temperaturas onde normalmente isto não ocorreria, causando danos em muitas culturas economicamente importantes (Kawahara, 2002). Moléculas protéicas e materiais localizados externamente à membrana da bactéria seriam os responsáveis por essa atividade. De acordo com Romeiro (2001) muitas plantas, principalmente aquelas que têm sua origem em regiões tropicais e/ou subtropicais, são incapazes de suportar a formação de gelo nos espaços intercelulares de seus tecidos. E quando tal fato ocorre, o sistema de membranas da célula vegetal entra em colapso e ocorre a mancha anasarca sucedida por morte dos tecidos por congelamento. Pouco é conhecido sobre os mecanismos que desencadeiam o processo de formação de lesões na MBM. Da mesma forma o mecanismo de disseminação da doença ainda é desconhecido. No ano de 2004 o pesquisador Walter F. Meirelles, da Embrapa Milho e Sorgo, observou lesões foliares na erva daninha, *Digitaria horizontalis* (capim-colchão) de ocorrência freqüente em áreas experimentais da cultura do milho. Chamou a atenção do pesquisador a semelhança entre essas lesões com aquelas da MBM. O material foi então coletado e dele isolado bactérias com morfologia muito semelhante à *P. ananatis* (Rocha e Paccola-Meirelles, 2008). A *D. horizontalis* é considerada uma das ervas daninhas mais comuns nas lavouras de milho, dentre outras culturas (Pasqualetto *et al.* (2001). Segundo Gitaitis *et al.* (2002) a *P. ananatis* pode sobreviver epifiticamente também em folhas de ervas daninhas. Desta forma, esta gramínea que foi considerada por Oliveira *et al.*(2001) como sendo predominante em campos experimentais de milho, poderia atuar como um hospedeiro alternativo de *P. ananatis*. Considerando a importância da doença e a falta de conhecimentos básicos sobre a disseminação da bactéria a campo, foi objetivo deste trabalho caracterizar aqueles isolados de *P. ananatis* oriundos de lesões de capim-colchão com aqueles de lesões da Mancha Branca do Milho e verificar a similaridade entre eles.

Materiais e métodos

Isolados bacterianos utilizados: Tanto os isolados da MBM como os isolados de lesões de capim colchão foram obtidos seguindo a metodologia descrita por Paccola-Meirelles *et al.*(2001). Os isolados de lesões da MBM foram identificados como: K1, K3, B2, E19, SR30, EMS05, WT1, WT2, WT8, F103-2, F103-3; e aqueles de lesões da gramínea *Digitaria horizontalis* como : CC04, CCA e CCB.



Avaliação da propriedade de Nucleação de Gelo: Isolados bacterianos incubados a 30°C em Tryptic Soy Agar (TSA) foram repicados em 5,0 ml de Tryptic Soy Broth (TSB) e incubados por 24 horas a 60 rpm e 30°C. Após esse período retirou-se 1,0ml da cultura para posterior teste INA. O material foi centrifugado e ao pellet adicionou-se 2,0 ml de água ultra pura esterilizada. Esta suspensão foi submetida a diluições seriadas em água ultra pura, e as diluições plaqueadas em meio TSA para se estimar o número de unidades formadoras de colônia (UFC). O material foi agitado em vortex e 100µl da suspensão bacteriana foram adicionados à tubos de ensaio contendo 1,0mL de água ultra pura esterilizada e mantidos em banho de gelo a -10°C. A formação imediata de gelo no tubo de ensaio revelou o fenótipo INA⁺ do isolado. Como controle foi adicionado uma alíquota de 100µl de meio TSB ausente de bactéria.

Análise molecular dos isolados

Caracterização por meio de PCR-RAPD: A extração de DNA genômico dos isolados bacterianos foi adaptado a partir do protocolo de Sambrook e Russel (2001). O DNA genômico foi amplificado utilizando-se os *primers* dos kits OPA, OPAC, OPAM e OPX, sendo as reações realizadas em termociclador Bio-Rad, em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 ng de DNA e, solução de tampão de PCR (200 mM Tris-HCl, pH=8,4, contendo 500 mM KCl), 5mM de MgCl₂, 200mM de cada um dos desoxinucleotídeos e 1.5 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). O programa do termociclador foi 5 minutos a 94°C, 45 ciclos, 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 36 °C e 1 minuto a 72 °C. Os produtos resultantes da amplificação da PCR-RAPD foram separados em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografados com sistema de foto documentação computadorizado de análise de gel. Os dados obtidos pela técnica de RAPD foram avaliados pelo programa estatístico NTSYS (Numeral Taxonomy System), no qual foram determinadas as matrizes de similaridades 15 genéticas e construção do dendrograma. A matriz de similaridade genética entre os isolados foi construída utilizando o coeficiente de Jaccard e os agrupamentos de acordo com o método UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Average).

Sequenciamento da região intergênica 16S/23S: Para análise molecular foram selecionados 10 isolados de lesões do milho e 2 isolados provenientes de lesões do capim-colchão. 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 *P. ananatis* (Gitaitis *et al.*, 2002) e o primer EC5 (5'-CGGTGGATGCCCTGGCA-3'), universal para amplificação de rDNA bacteriano (Gurtler e 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 minutos a 14.000 RPM e o precipitado ressuspendido 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 minuto e acrescidas de 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e 100 µL de SDS 20% e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação por 2 minutos 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 minutos 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 minutos 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 minutos 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 minutos a 14.000 RPM, descartando-se o álcool. As amostras foram lavadas rapidamente com etanol 70%, deixadas para secar o sedimento (pellet) ressuspensionado em 100 µL de água esterilizada. A quantificação do DNA foi realizada por leitura espectrofotométrica (OD260/280) 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 minuto seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C (anelamento), e 2 minutos a 72 °C (extensão). Finalmente a reação foi incubada por 10 minutos 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) contendo 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 pmoles/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 minutos por 30 ciclos. Em seguida, em cada tubo de reação foi adicionado 40µL de isopropanol 75%, em temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos, 14.000 RPM à 20°C, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de etanol 70% (Merck) e centrifugado por 10 minutos a 14.000 RPM, 20°C. Após o descarte do sobrenadante o material foi secado em temperatura ambiente no escuro e ressuspensionado em 10µL de formamida Hi-Di. O DNA foi desnaturado a 95°C por 5 minutos 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 contigs 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.

Caracterização quanto à utilização de diferentes fontes de carbono (Biolog): Foram selecionados os isolados :K1, K3, WT2, F103-1 e F103-3 de lesões da MBM e os isolados CCA,CCB e CC04 de lesões de capim-colchão para serem testados em 95 diferentes fontes de Carbono. Os isolados foram cultivados em meio NA (Nutriente Agar) e posteriormente inoculados nas placas de BIOLOG (Microplaca GN2 – Biolog catalogo 1101) de acordo com



a metodologia descrita por Marriel *et al.* (2004). Após incubação à 30°C verificou-se o crescimento dos isolados em cada uma das fontes de carbono. A matriz de similaridade entre os isolados, em relação às fontes de carbono utilizadas, foi construída utilizando o coeficiente de Jaccard e os agrupamentos foram realizados de acordo com o método UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Average) pelo programa NTSYS.

Resultados e Discussão

Avaliação da propriedade de Nucleação de Gelo

A maioria das linhagens foram INA⁺, sendo que tanto os isolados oriundos de lesões da MBM quanto aqueles isolados de lesões do capim-colchão apresentaram cepas INA⁺ (Tabela 1). Em isolados como o CC04, uma concentração celular de 10⁸UFC/mL foi suficiente para provocar a nucleação de gelo, enquanto que outros como o CCB, uma concentração de 10¹⁰UFC/mL não foi suficiente (Tabela 1), demonstrando a variabilidade entre os isolados, com relação a este caráter.

Tabela 1. Atividade de Nucleação de Gelo nos isolados bacterianos.

Linhagens	UFC/ml	INA
K1*	1,20x10 ¹⁰	+
K3*	2,11x10 ¹⁰	+
WT1*	5,22x10 ¹⁰	+
WT2*	2,75x10 ⁹	+
WT8*	3,26x10 ⁹	-
SR30*	5,60x10 ⁸	-
E19*	3,21x10 ⁸	-
B2*	5,20x10 ⁹	+
EMS05*	5,33x10 ⁹	+
F 103-1*	1,21 x10 ⁹	+
F 103-3*	0,64 x10 ⁹	+
CC04**	1,17x10 ⁸	+
CCA**	2,35x10 ¹⁰	-
CCB**	1,00x10 ¹⁰	-
Cont TSB	-/-	-
Cont H ₂ O	-/-	-

* = isolado da Mancha Branca do Milho; ** = isolado de lesões capim-colchão

Dos 11 isolados de lesões de MBM, 8 foram INA⁺. O isolado de lesão de capim-colchão, CC04, também apresentou atividade INA⁺, e deve ser ressaltado que a formação de gelo ocorreu em uma menor concentração bacteriana comparado com os demais isolados. Para que ocorra o processo nucleação de gelo é necessário uma quantidade populacional elevada de bactérias INA⁺, e isto está relacionado com a quantidade de nucleantes de gelo ativos formados por estas bactérias no período de congelamento (Lindow, 1983). Assim quanto maior o número de nucleantes de gelo ativos maior será a eficiência deste processo (Hirano e Upper, 2000). Observou-se uma alta variabilidade para esta característica entre os isolados.



Análises moleculares

Caracterização por meio de PCR-RAPD: Foram avaliados 15 *primers* para a amplificação do DNA por RAPD dos isolados, sendo que apenas sete foram selecionados: OPA2 e 10; OPX1, 6, 11, 18 e 19. As análises dos perfis eletroforéticos obtidos com estes *primers* permitiu a identificação de 211 locos. Estes dados foram utilizados nas análises de similaridade genética e agrupamento para a construção do dendrograma (Figura 1). Foram analisadas 11 linhagens bacterianas sendo, oito obtidos de lesões da MBM (E19, K1, K3; EMS05 e F7; e WT2, WT7 e WT9) e três de lesões de capim-colchão (CCA,CCB e CC4). O padrão de eletroforese do DNA dos isolados com os sete *primers*, demonstrou que os mesmos apresentaram um perfil de amplificação bem variado. Verificou-se a presença de polimorfismo entre os todos isolados obtidos da MBM do mesmo local, e entre os provenientes de locais diferentes, além dos obtidos das lesões de capim-colchão. Estes dados indicam a existência de uma variação genética intra e interespecífica nas linhagens bacterianas. Não foi possível detectar a presença de qualquer fragmento monomórfico nas reações de RAPD. Esta ausência estaria relacionada, principalmente, com a grande variabilidade genética observada nos isolados. A análise dos perfis genéticos obtidos pelos sete *primers*, utilizando o programa NTSYS, o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, gerou um dendrograma (Figura 1).

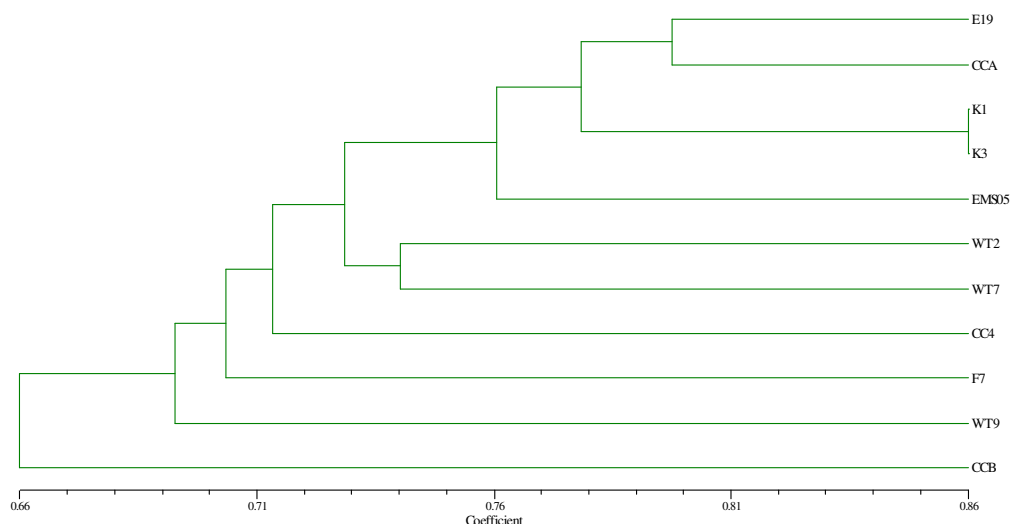


Figura 1. Dendrograma baseado no método UPGMA, com os sete primers analisados, de acordo com os perfis de amplificação gerados por PCR- RAPD, dos isolados de *P. ananatis* obtidos de lesões de Mancha Branca do Milho, de folhas aparentemente saudáveis e de lesões em *D. horizontalis*.

O valor da similaridade genética para o agrupamento dos isolados de lesões da MBM e aqueles de lesões de capim-colchão apresentaram uma similaridade genética variando entre 69,3 a 79,8%, o que demonstra a existência de uma grande variabilidade entre todos os isolados analisados (Figura 1). A não divisão de dois agrupamentos distintos (isolados de lesões da MBM e de lesões de capim-colchão) indica que todos os isolados possam se tratar da mesma espécie bacteriana. Porém se faz necessário uma otimização desta técnica, aumentando a quantidade de amostras, principalmente as obtidas de *D. horizontalis* e também o número de *primers* que possa revelar maior variabilidade entre os isolados em estudo. A técnica de RAPD vem sendo muito empregada na caracterização de bactérias patogênicas



como é o caso da *Ralstonia solanacearum* que provoca Murcha Bacteriana na Batata (Silveira *et al.*, 2005) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, que causa dano ao feijão (Nunes *et al.*, 2008). No entanto, trabalhos de caracterização genética de *P. ananatis* isolados de milho, não são encontrados na literatura.

Seqüenciamento dos isolados: 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, seqüências diferentes foram obtidas para um mesmo amplicon confirmando a existência de multicópias de rDNA. Em *P. stewartii* é descrita apenas uma cópia de rDNA.

Dez isolados da lesão do milho e um isolado de lesão do capim-colchão apresentaram elevada identidade de seqüências com *P. ananatis*, variando entre 97% e 100% e um dos isolados do capim-colchão apresentou 100% de identidade com *Pseudomonas fulva*, *P. parafulva* e *P. putida*.

A identidade das seqüências 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 87-92%. 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*.

Caracterização quanto à utilização de diferentes fontes de carbono (Biolog): Um dendrograma foi gerado a partir dos resultados da análise dos diferentes fontes de carbonos utilizado pelas bactérias (Figura 2). Não houve uma distinção entre os isolados de lesões da MBM e aqueles de lesões de capim-colchão. O perfil gerado pelo Biolog demonstrou que a similaridade em relação às fontes de carbonos utilizadas para agrupá-los está próxima de 70% uma indicação de que todos os isolados pertençam à mesma espécie.

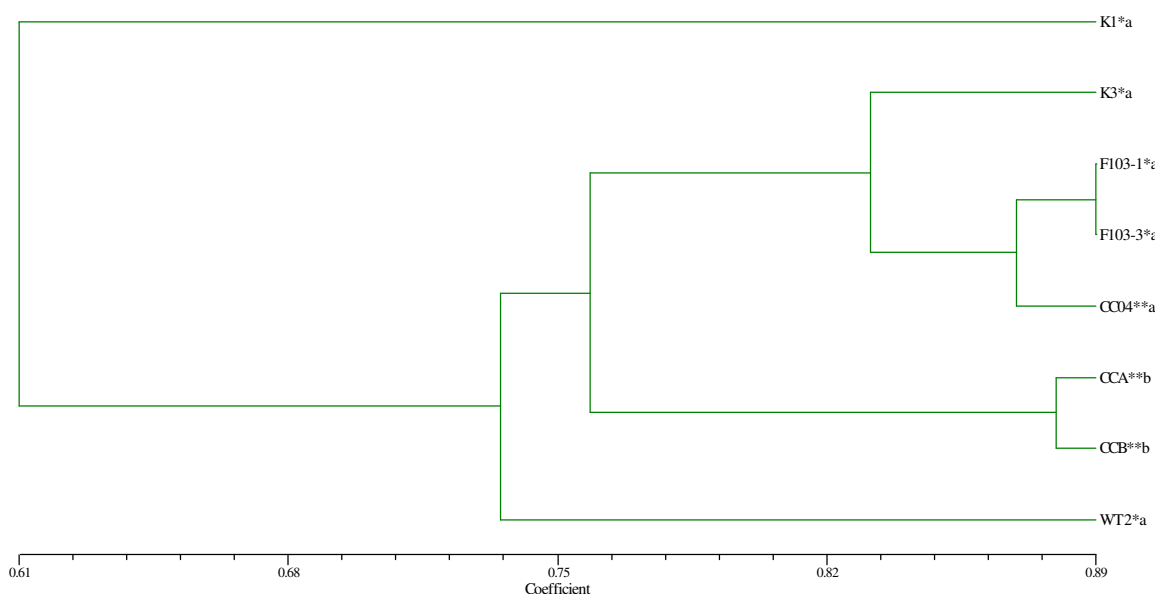


Figura 2. Dendrograma mostrando o perfil do Biolog para os isolados estudados. Nele há relação entre 05 isolados oriundos da Mancha Branca do Milho e os 03 isolados obtidos das lesões de capim-colchão, baseado na utilização diferencial das 95 fontes de carbono disponíveis nas Microplacas de Biolog GN.* = isolados obtidos da MBM;** = isolados obtidos do capim-colchão; a = INA⁺ e b = INA⁻.

Conclusão

O seqüenciamento das amostras bacterianas confirmou o que foi sugerido pelo perfil do RAPD/PCR e do Biolog, no qual as linhagens são pertencentes à *P. ananatis*. Os resultados aqui apresentados comprovaram a identidade da bactéria isolada de lesões foliares de capim colchão, identificando-a como sendo a *P. ananatis*, mesma espécie do agente etiológico da MBM. Desta forma o capim colchão pode ser considerado um hospedeiro alternativo da doença.

Referências Bibliográficas

BOMFETI, C.A, *et al.* Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. *Trop Plant Pathol.* v.33, 63-66, 2008.

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, 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.142:3-16. 1996.

HIRANO, S.S.; UPPER, C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev.* v.64, 624-653, 2000.

KAWAHARA, H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria. *J. Biosci and Bioeng.* v.94, 492-496, 2002.

LINDOW, S.E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Ann Rev Phytop.* v. 21, 363-384, 1983.

NUNES, W. M. C. *et al.* Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* isolates. *Summa Phytop.* v.34, 228-231, 2008.

OLIVEIRA, M. F. *et al.* Efeito da palha e da mistura atrazine e metolachlor no controle de plantas daninhas na cultura do milho, em sistema de plantio direto. *Pesq Agropec Bras.* v.36, 37-41, 2001.



PACCOLA- MEIRELLES, L.D. *et al.* Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. *J Phytopathol.*v.149, 275-279, 2001.

PASQUALETTO, A. *et al.* Ocorrência de plantas daninhas na cultura do milho (*Zea mays* L.) em sucessão a culturas de safrinha no sistema plantio direto. *Pesq. Agropec. Trop.* v. 31, 133-138, 2001.

ROCHA, K.R.; PACCOLA-MEIRELLES. Fatores envolvidos na reprodução da doença Mancha Branca do Milho. In: Encontro de Bolsista do Programa de Apoio a Ações Afirmativas para Inclusão Social, 2008, Universidade Estadual de Londrina/ Centros de Ciências Biológicas, *Anais do III Encontro de Bolsistas do Programa de Apoio a Ações Afirmativas para Inclusão Social.* UEL-PR, CD-ROM, 2008

ROMEIRO, R.S. *Métodos em Bacteriologia de Plantas.* Imprensa Universitária. Viçosa: UFV, 279p, 2001.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D. *Molecular cloning : a laboratory manual.* 3ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVEIRA, J. P. *et al.* Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com Murcha Bacteriana, por PCR- Rep e RAPD. *Fitop. bras.* v. 30, 616-622, 2005.

WALCOTT, R.R.; CASTRO A.C.; DIAS-PEREZ, J.C.; Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. *Plant Disease*, v. 86, 106-111, 2002.

WYSMIERSKI, P.T. *et al.* Monitoramento da população epifítica sobre folhas de milho e avaliação de métodos artificiais de inoculação de isolados obtidos de lesões da Mancha Branca do Milho. In Anais do XXVI Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Belo Horizonte, CD ROM., 2006

