



Paccola-Meirelles LD¹; Bomfeti, CA¹; Souza-Paccola, EA¹; Marriel, IE²; Mesquita, SFP¹
Massola Jr., N³, Casela, CR²; Meirelles, WF²; Ferreira, AS²

¹Universidade Estadual de Londrina, CP 6001; CEP 86051 990/Londrina/PR.
paccola@uel.br

²Embrapa Milho e Sorgo, CP 151 – Sete Lagoas/ MG, casela@cnpmc.embrapa.br

³ESALQ/USP Piracicaba/SP

INTRODUÇÃO

A doença de milho (*Zea mays*), conhecida como mancha de phaeosphaeria (Figura 1A) vem sendo observada com alta intensidade em lavouras de milho no Brasil desde o início dos anos 80. Os sintomas iniciam-se pelo aparecimento, nas folhas, de manchas levemente cloróticas, aquosas do tipo anasarca que tornam-se, posteriormente, necróticas de coloração palha. As lesões podem ser circulares a elípticas com 0,3 a 1 cm de diâmetro (Fernandes & Oliveira, 1997; Paccola-Meirelles *et al.*, 1998), podendo coalescer e tornarem-se irregulares. A expressão da doença é variável dependendo do genótipo da planta (Paccola-Meirelles *et al.*, 2002). Desde que a doença se estabeleceu em nosso País, poucos avanços foram conseguidos na tentativa de esclarecer a sua etiologia. Inicialmente a doença foi descrita como sendo a mancha foliar de Phaeosphaeria (Fantim, 1994) causada pelo ascomiceto *Phaeosphaeria maydis*, f. imperf. *Phyllosticta* sp. (Rane *et al.*, 1966), porém vários autores relatam a dificuldade no isolamento deste fungo a partir das lesões (Cervellati *et al.*, 2002, Paccola-Meirelles *et al.* 1999, Amaral *et al.*, 2002). Em trabalho recente, Paccola-Meirelles *et al.* (2001), isolaram uma bactéria de coloração amarela, identificada como *Pantoea ananas* (syn. *Erwinia ananas*), a partir de lesões jovens. Esta bactéria quando inoculada em plantas de milho sob condições controladas reproduziu sintomas semelhantes aos do campo. No entanto ainda há controvérsias no que se refere ao agente causal. Amaral *et al.* (2002) sugeriram a existência de diferentes espécies fúngicas provocando sintomas da doença que, de acordo com o local de cultivo, uma ou outra espécie poderia ser o agente responsável. Em função destas discordâncias várias técnicas foram aplicadas com o objetivo de definir o real agente causal desta importante doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Frequência de isolamento do agente etiológico: Lesões foram coletadas de diferentes regiões produtoras de milho no Norte do Paraná e Minas Gerais a fim de avaliar a frequência de isolamento dos fungos e da bactéria. Lesões do tipo anasarca foram desinfectadas em Cloramina T 2%; parte da lesão foi colocada em meio para crescimento de fungos (BDA acrescido de solução de estreptomicina) e parte em meio para cultivo de bactérias (TSA acrescido de ciclohexamida). Os isolamentos foram realizados nas safras de 2002, 2003 e 2004.

Inoculação em casa de vegetação: O agente obtido em maior frequência durante o processo de isolamento foi inoculado em plantas de milho de 30 dias de idade do cultivar HS 200. O experimento foi conduzido em casa de vegetação sob condições controladas, conforme descrito por Paccola - Meirelles *et al.* (2001).

Análises através da Microscopia de Luz e Microscopia eletrônica de transmissão (MET): Lesões do tipo anasarca, obtidas a campo, foram coletadas, desinfectadas, fixadas em Bouin, desidratadas, diafanizadas em série de etanol-xilol, incluídas em paraplast e coradas pela técnica de Gram para tecidos. Lesões de campo e obtidas no processo de inoculação artificial com a bactéria foram processadas para visualização na MET. Estas foram desinfectadas, fixadas, desidratadas, emblocadas em Spurr e seccionadas em ultramicrótomo. As secções foram observadas em microscópio Zeiss EM 900.

Teste de ELISA indireto: Anti-soro policlonal, produzido em coelho contra células bacterianas isoladas de lesões do tipo anasarca, foi utilizado para a identificação da bactéria em suspensão de tecidos lesionado, através do teste ELISA indireto. As preparações antigênicas foram obtidas a partir de segmentos foliares contendo lesões anasarcas (0,1g) e segmentos destituídos de lesão (0,1 g - controle), os quais foram desinfectados e macerados em 1,5 mL de tampão PBS (acrescido de 2% Polivinil pyrrolidona, 0,2% skim milk e 0,05% tween 20). A ocorrência de possíveis reações cruzadas, também foi verificada. As preparações antigênicas foram aplicadas em microplacas de poliestireno de 96 well em tampão PBS e incubadas overnight a 4º C. Após lavagem das canaletas com PBS -Tween 0,05%, foi acrescentado PBS-Caseína para bloqueio dos sítios livres. Adicionou-se o anti-soro (1: 400). As canaletas foram lavadas antes da adição da fosfatase alcalina conjugada (fosfatase-anti IgG). O p-Nitrophenyl Phosphato foi usado como substrato. A conversão do substrato foi quantificada pela medida de absorbância em 450 nm.

Extração de DNA diretamente das lesões e Reações de PCR: Folhas contendo lesões foram coletadas e lavadas com sabão neutro. Cerca de 1 g de lesões do tipo anasarca e 1 g de lesões necrosadas foram recortadas e maceradas em nitrogênio líquido. DNA total foi extraído segundo a técnica descrita por Doyle & Doyle (1987). Os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando-se os seguintes oligonucleotídeos: ITS4 (Internal Transcribed Spacer do rDNA -universal para fungos), e seqüências do gene codificando o 16S rRNA (16S DNAr) e do gene codificando a subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) (específicos para bactérias). Cada 25 μ L de reação continha tampão de PCR 1X, 2 mM de MgCl₂, 100 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de oligonucleotídeos iniciadores, 25 ng de DNA e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies - Brasil). As condições de amplificação da região ITS de 645 pb utilizando ITS 4 foram 1'- 94°C, 1'- 50°C, 90"- 72°C durante 40 ciclos. Todas as reações foram finalizadas com uma extensão a 72°C por 7 min. Um controle negativo foi feito para cada oligonucleotídeo iniciador, onde o DNA da reação foi substituído por água. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0.5 μ g/ml), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e estocadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Em 40% das lesões, foi isolada uma bactéria de colônia lisa, com pigmentação amarela brilhante (Figura 1B), semelhante àquela descrita por Paccola-Meirelles *et al.* (2001). Os fungos isolados no meio BDA mostraram uma diversidade inconstante, sem predominância de uma só espécie. A dificuldade do isolamento do fungo foi previamente documentada por outros autores (Cervelatti *et al.*, 2002; Amaral *et al.*, 2002).

Inoculações em casa de vegetação, sob condições controladas, foram conduzidas com o isolado bacteriano e reproduziram sintomas da doença (Figura 2). As folhas desenvolveram lesões cloróticas de coloração verde escura, típicas do estágio inicial da doença, passando a necróticas posteriormente, confirmando os resultados obtidos anteriormente. Não foi observado sintomas nas plantas controle. Análises através da Microscopia de luz e MET permitiram evidenciar a presença de um grande número de bactérias no interior de lesões do tipo anasarca (Figura 3). A MET revelou, no espaço intercelular, a presença de bactérias em forma de bastonetes com 0.25 a 0.5 μm de largura e 1.0 a 3.0 μm de comprimento, tanto em lesões coletadas a campo como naquelas obtidas por inoculação artificial. Foi evidenciada também uma grande desorganização do tecido foliar na área das lesões. Bactérias não foram observadas nos exemplares assintomáticos. Apenas nas lesões em estágios avançados de necrose foi possível observar a presença de hifas e de estruturas reprodutivas fúngicas. Os testes de ELISA indireto permitiram confirmar a presença da bactéria nas lesões, pois os valores de A_{450} foram consistentemente maiores nas amostras contendo as anasarcas. Os resultados do PCR com sequências específicas para fungos e bactérias no DNA extraído diretamente das lesões são apresentados na Figura 4. Amplificação foi obtida apenas com as sequências DNAr 16S e *rpoB*. Não foi observado amplificação no oligonucleotídeo ITS4, universal para fungo, o que indica ausência do fungo no interior das lesões avaliadas. Lesões necrosadas não apresentaram amplificação em nenhuma das sequências avaliadas, sugerindo uma diminuição da população bacteriana neste estágio.

Os resultados aqui apresentados comprovam aqueles obtidos anteriormente por Paccola - Meirelles *et al.* (2001) que indicam a bactéria como o agente etiológico da doença. Os fungos instalaram-se posteriormente em lesões pré-estabelecidas pela bactéria. Com base nos dados apresentados neste e em trabalhos anteriores, consideramos que a doença vem sendo erroneamente denominada de Mancha foliar de *Phaeosphaeria* e sugerimos o uso do termo Pinta branca em substituição a este, como já utilizado por alguns autores.

LITERATURA CITADA

- Amaral, A L; Soglio, FK; Wernz Neto, AW; Pegoraro, DG; Vaccaro, E; Fantim, GM; Barbosa Neto, JF. Determinação de Agentes Causais de Manchas semelhantes à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* em Milho (*Zea mays*) XXIV Congresso Brasileiro de Milho e Sorgo., 2002.
- Cervelatti EP, Paiva E, Meirelles, WF, Casela CR, Fernandes FT, Teixeira FF, Paccola-Meirelles. Characterization of fungal isolates from picnidia and pseudothecia from lesions of *Phaeosphaeria* leaf spot in maize. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, Ed. ABMS: Sete Lagoas, MG., v.1, n.3, p.30-37, 2002.
- Doyle JJ, Doyle, JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v.12, p.13-15.1987

Fantim GM. Mancha de *Phaeosphaeria*, doença do milho que vem aumentando sua importância. *Biológico*, v.56, p. 39, 1994.

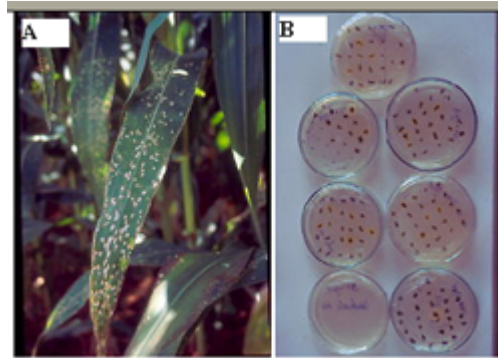
Fernandes FT, Oliveira E,. Principais Doenças na Cultura do Milho. Sete Lagoas, MG.Brasil : Embrapa-Circular Técnica, 26. 80p. 1997.

Paccola-Meirelles LD, Casela CR, Ferreira AS, Marriel IE, Meirelles WF, Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, p.314-315, 1999.

Paccola-Meirelles LD, Casela CR, Parentoni SN, Meirelles WF, Ferreira AS, Marriel IE. Reação de linhagens de milho (*Zea mays*) a uma bactéria isolada de lesões da mancha de *phaeosphaeria*.In: XXII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2000, Uberlândia., 2000.

Paccola-Meirelles, LD; Ferreira, AS; Meirelles, WF; Marriel, IE; Casela, CR. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. *Journal of Phytopatology*, v. 149, p. 275-279, 2001.

Paccola-Meirelles LD; Meirelles, WF; Cervelatti, EP; Maki, CS; Casela, CR; Fernandes, FT; Ferreira, AS. Caracterização morfológica das lesões da mancha foliar por *Phaeosphaeria* em



híbridos de milho e avaliação da incidência do estágio sexuado e assexuado do patógeno. XXII Congresso Nacional de Milho e Sorgo,1998.

Paccola-Meirelles LD, Meirelles WF, Parentoni SN, Marriel IE, Ferreira AS, Casela CR. Reaction of maize inbred lines to a bacterium, *Pantoea ananas*, isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. *Plant Breeding and Applied Biotechnology*, v. 2, p. 587-590, 2002.

Rane MS, Payak MM, Renfro BL. A *Phaeosphaeria* leaf spot of maize In: Proceedings of the Symposia on Diseases of Rice Maize Sorghum and Millets 1966 New Delhi India: The Indian Phytopathological Society, p. 8-10, 1966.



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C
