

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

TATIANA BORGES SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Pantoea ananatis* OBTIDOS DE FOLHAS
DE MILHO COLETADAS EM GOIÁS**

**Uberlândia - MG
Novembro- 2011**

TATIANA BORGES SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Pantoea ananatis* OBTIDOS DE FOLHAS
DE MILHO COLETADAS EM GOIÁS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao curso de Agronomia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi

**Uberlândia – MG
Novembro– 2011**

TATIANA BORGES SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Pantoea ananatis* OBTIDOS DE FOLHAS
DE MILHO COLETADAS EM GOIÁS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao curso de Agronomia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 11 de novembro de 2011

Prof. Dr. Jonas Jäger Fernandes
Membro da Banca

Eng. Agr. Fernando Oliveira Franco
Membro da Banca

Prof^ª. Dr^ª. Nilvanira Donizete Tebaldi

Orientadora

RESUMO

A doença de final de ciclo, conhecida como mancha-branca do milho foi inicialmente identificada como mancha de *Phaeosphaeria*, ou seja, causada por um fungo, porém, através de estudos a doença foi descrita como sendo causada pela bactéria *Pantoea ananatis*. O objetivo deste trabalho foi avaliar caracterização e identificação de isolados de *Pantoea ananatis* obtidos de folhas de milho coletadas em Goiás. O isolamento da bactéria foi feito através de folhas de milho com os sintomas de lesões encharcadas, os isolados de bactéria codificados como UFU A18 (Morrinhos-GO) e UFU B13 (Planaltina-GO) no Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os híbridos utilizados foram identificados, sendo resistentes o A1 e A2 e suscetíveis o B1, B2 e B3. Foi feita a caracterização e identificação dos isolados confirmando ser a bactéria *Pantoea ananatis*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Uberlândia e no Laboratório de Virologia Vegetal e Fitopatologia (LAVIV) em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições. A unidade experimental foi de um vaso, contendo três plantas, e foi montado em esquema fatorial 2 isolados x 5 híbridos. Foram feitas quatro avaliações, a primeira a partir do quarto dia após a inoculação, e as demais com intervalos de três dias. Os dados da AACPD foram submetidos à análise de variância através do programa estatístico SISVAR. Os híbridos inoculados com a suspensão bacteriana contendo o isolado A18 não apresentou diferença no comportamento em relação aos sintomas. O híbrido A1 apresentou mais resistência em comparação aos demais, quando inoculado com a suspensão bacteriana contendo o isolado UFU B13. Independente da suspensão bacteriana, os híbridos demonstraram desempenho semelhante, porém o híbrido A1, que quando inoculado com a suspensão bacteriana UFU B13 se mostrou resistente. Os resultados indicam que o isolado UFU A18 é o que se apresenta maior patogenicidade aos híbridos de milho estudados.

Palavras-chave: mancha-branca, *Zea mays*, resistência.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	4
2.REVISÃO DE LITERATURA	6
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1.Isolamento e obtenção do inóculo	10
3.2.Reação de hipersensibilidade.....	10
3.3.Caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados bacterianos.....	11
3.4.Teste de patogenicidade.....	11
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1.Caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados bacterianos e reação de hipersensibilidade.....	13
4.2.Reação de híbridos de milho à <i>Pantoea ananatis</i>	14
5.CONCLUSÕES	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
Anexo A.....	22

1- INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem grande importância no cenário brasileiro, abrangendo todas as regiões do país. No cenário mundial, a safra 2010/2011 a área plantada com milho foi de 7,2 milhões de ha, sendo a produção brasileira de 30,7 milhões de toneladas (JOHN DEERE, 2011). Com uma produção elevada que ocorre em quase todas as safras, é necessário uma maior atenção com a lavoura, visto que esta tem sido alvo de ataque de pragas e doenças, sendo impedimento ao maior retorno econômico para os agricultores.

Com o interesse na maior produtividade por parte dos agricultores, associada à lucratividade ocorreu uma ampliação das épocas plantio, na safra e safrinha, expansão da fronteira agrícola, o uso do sistema de plantio direto, o manejo como a irrigação, além da não boa escolha de híbridos. Todos esses fatores favoreceram os prejuízos na cultura do milho causados pela maior incidência e severidade das principais doenças, surgindo à necessidade de procura por híbridos resistentes (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997; PEREIRA et al., 2005).

O milho tem como fator limitante as doenças foliares causadas por fungos como: a mancha-foliar-de-cercospora (*Cercospora zea-maydis*), o míldio (*Peronosclerospora sorghi*), a ferrugem (*Puccinia polysora*), a ferrugem-tropical (*Physopella zae*) e o complexo da mancha branca do milho (*Phaeosphaeria maydis*, *Pantoea ananatis*) e a bactéria causadora da podridão-bacteriana (*Dickeya zae* = *Erwinia chrysanthemi* pv. *zae*), (CASELA et al., 2006).

É difícil afirmar qual ou quais das doenças ocorrentes no milho seja a mais importante, sendo que a incidência de cada uma varia de região para região além do ano agrícola (CASELA ET al., 2006).

A mancha-branca do milho foi inicialmente identificada como mancha de *Phaeosphaeria*, causada pelo fungo *Phaeosphaeria maydis* (FANTIN, 1994). Mais tarde após estudos de Paccola-Meirelles et al. (2001), a doença foi descrita como sendo causada pela bactéria *Pantoea ananas* como o patógeno primário, com a presença ainda da possibilidade de espécies fúngicas colonizarem as lesões realizadas pela bactéria (BOMFETI et al. 2008).

Inicialmente a bactéria foi descrita como *Bacillus ananas* Serrano 1928, *Bacterium ananas* (SERRANO, 1928) Burgvits 1935, *Pectobacterium ananas* (SERRANO, 1928) Patel

e Kulkarni 1951, *Erwinia herbicola* var. *ananas* (SERRANO, 1928) Dye 1969. Mergaert et al. 1993 propuseram a transferência do nome de *Erwinia ananas* para o *Pantoea ananas*. Truper e Clari, 1997 sugerem o nome de *Pantoea ananatis*, pois ela não é patogênica ao abacaxi, sendo que o nome científico do abacaxi é *Ananas comosus*, assim o nome *ananas* se remete a esse fruto.

Como manejo para a diminuição da ocorrência de doenças na cultura do milho pode ser citados, além da redução do inóculo na lavoura, à preocupação que os produtores devem ter com a semeadura na época adequada, evitando o período crítico para o desenvolvimento de doenças, a utilização de sementes certificadas e tratadas, a utilização de rotação com culturas não suscetíveis, o manejo da lavoura como a adubação, a população de plantas, o controle de pragas e plantas infestantes e ainda a colheita no momento correto. A maioria dos produtores utiliza cultivares resistente a algumas doenças, e para que essa resistência se mantenha é necessária à atenção com o manejo integrado (CASELA ET AL., 2006).

A opção encontrada e que se torna suficiente para o controle da doença mancha branca do milho, é a utilização de variedades resistentes a essa doença, mas que ainda está em estudo por pesquisadores e produtores, devido à existente dúvida sobre qual é o patógeno precursor da doença ou mesmo da diversidade de patógenos, que torna os produtos químicos pouco específicos e eficientes.

O controle genético é uma das formas mais estudadas, além de mais apropriada para a obtenção de variedades resistentes, através de cruzamentos entre as cultivares, obtendo resultados como produtos que podem ser encontrados no mercado (LOPES et al., 2007); para o estabelecimento de estratégias de manejo.

Segundo Romeiro (2005), ainda não se desenvolveu produtos químicos eficientes capazes de curar uma planta ou mesmo protegê-la contra infecções bacterianas de forma eficiente. O uso de variedades resistentes, pela praticidade e baixa relação custo benefício para o produtor, é a melhor estratégia de controle dessas doenças. Deve-se ressaltar, ainda, que a utilização de híbridos resistentes, como método de controle de doenças em plantas, por meio do melhoramento genético, é o mais econômico e sustentável na maioria das culturas.

Assim o objetivo deste trabalho foi de identificar os isolados de *Pantoea ananatis* obtidos de folhas de milho coletadas em Goiás, pela caracterização bioquímica e fisiológica, e avaliar a reação de híbridos de milho à bactéria.

2- REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos vinte anos pode-se observar o aumento significativo na produção de milho no Brasil, passando de 22 milhões para 57 milhões de toneladas e, analogamente, a produtividade passou de 1.840 para 4.156 kg ha⁻¹ (CONAB, 2011). Entretanto, a produtividade média brasileira ainda é considerada baixa quando comparada a outros países produtores, como China (5.100 kg ha⁻¹), Argentina (8.300 kg ha⁻¹) e Estados Unidos (10.340 kg ha⁻¹) (PAES, 2006; USDA, 2010). Dentre os fatores que têm contribuído para a baixa produtividade da cultura do milho no Brasil, as doenças têm sido consideradas um dos mais importantes (PEREIRA et al., 2005 apud PAES, 2006).

A mancha branca do milho, causada pela bactéria *Pantoea ananatis* não apresentava importância para o Brasil, pois ocorria no final do ciclo da cultura. Porém atualmente tem sido considerada como uma das principais doenças da cultura, e encontra-se disseminada em praticamente todas as regiões produtoras de milho (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997), causando perdas superiores a 60% na produção e qualidade do milho (CASELA et al., 2006).

O ataque da doença vem ocorrendo de forma severa em plantas jovens, sendo já observada no campo em cultura com 40 dias, podendo atingir a planta por completo. Em condições favoráveis, a doença causa a diminuição da taxa fotossintética e a seca prematura da planta, reduzindo o período de enchimento dos grãos, com redução em seu tamanho e peso e, conseqüentemente, em sua produtividade. De acordo com Fernandes et al. (1994), o nitrogênio das plantas doentes tende a ficar acumulado no colmo não se translocando para os grãos, o que influencia na queda de produção.

A bactéria *Pantoea ananatis* já foi relatada causando os mesmos sintomas detectados no milho, em plantas hospedeiras como as culturas do melão, arroz, cebola, aveia, eucalipto, tomate (WEELLS et al., 1987; BRUTON et al., 1991; WATANABE ET al., 1996; GITAITIS; GAY, 1997; AZAD ET al., 2000; COTHER et al., 2004) e também do capim-colchão (*Digitaria horizontalis*).

Paccola-Meirelles et al. (2001), conseguiram isolar a bactéria *Pantoea ananatis* a partir de lesões iniciais da mancha foliar de *Phaeosphaeria*, e quando inocularam a bactéria em plantas de milho detectaram os sintomas semelhantes causados por essa doença, foi então reconhecida como o agente causador da doença, após a conclusão dos postulados de Koch.

Em seguida, avaliaram o desempenho de diversos genótipos de milho, previamente selecionados entre suscetíveis e resistentes, e quando inoculados com a bactéria, de forma artificial, as reações foram análogas à analisada em condições de campo (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2002).

Os métodos de inoculação por aspersão e pressionamento das folhas com gaze foram eficientes em causar infecção de *Pantoea ananatis* nas folhas de híbrido de milho, no entanto, o método por aspersão apresentou maior rapidez e praticidade (CAIRES et al., 2010).

A característica dos sintomas dessa doença é a presença de manchas claras ou translúcidas nas folhas, do tipo anasarca e depois podendo ficar de coloração palha (REIS; CASA, 1996). Em trabalhos realizados por Fantin (1999) os sintomas são manchas límpidas, com forma arredondada, irregular, e bordos definidos, porém estes sintomas são imperceptíveis até chegar ao tom de cor verde-pardo escura, com evolução à coloração palha (INFOBIBOS, 2009). Dependendo das condições, quando favoráveis à doença pode causar seca antecipada das folhas podendo ter como conseqüências a redução dos pesos dos grãos e mesmo do ciclo da cultura (PINTO et al., 1997).

Algumas diferenças foram detectadas nos sintomas, entre à mancha de *Phaeosphaeria* encontrados na inoculação artificial com a bactéria *Pantoea ananatis*, onde, na doença causada pela bactéria, observou manchas elípticas na direção das nervuras (BOMFETI et al., 2007).

Existem hipóteses que as lesões do tipo anasarca ocorreriam em estádios iniciais da planta, e quando em estádios mais evoluídos de necrose a lesão seria causado por fungos (MARRIEL et al., 2004; BOMFETI et al., 2004). Explicando a diferenciação entre os sintomas.

De acordo com Rocha e Paccola-Meirelles (2009), a *Pantoea ananatis* é uma bactéria epifítica, com propriedades de nucleação do gelo com um aumento populacional crescente á medida que o milho atinge a fase de pré-florescimento. Nesta fase, quando a população encontra-se elevada e as condições climáticas favoráveis, por um mecanismo ainda desconhecido, a bactéria torna-se patogênica, desenvolvendo lesões foliares encharcada. Em relação, ao tamanho populacional necessário para que a bactéria desenvolva os sintomas em condições controladas, quanto maior a população bacteriana, maior o número de lesões e suspensões mais diluídas não tiveram sucesso na reprodução dos sintomas.

A mancha branca do milho se desenvolve bem em condições de alta precipitação, alta umidade relativa e baixas temperaturas noturnas (14°C), nestas condições ocorrem os prejuízos à cultura do milho, e a perda na produção pode chegar a 60 % (CASELA, et al., 2006).

Doenças bacterianas são consideradas como problemas fitopatológicos e agrônômicos sérios em qualquer parte do mundo e, especialmente em países tropicais, por razões técnicas, climáticas dentre outras. Entre as dificuldades pode-se mencionar a dificuldade técnica de controle em virtude de este ser quase que exclusivamente por exclusão e, eventualmente de erradicação. Segundo Romeiro (2005), ainda não se desenvolveu produtos químicos eficientes capazes de curar uma planta ou mesmo protegê-la contra infecções bacterianas de forma eficiente. Entretanto, para o controle *P. ananatis* diversos trabalhos com resultados eficientes, quanto à resistência genética e o controle químico a base de fungicidas e bactericidas tem sido publicados (ROMEIRO, 2005).

O apoio do melhoramento genético tem sido significativo no desenvolvimento de cultivares resistentes (ROBINSON, 1996). A resistência genética é de grande relevância quando soluciona problemas epidêmicos causados por doenças, como o ocorrido nos EUA em 1970 com o fungo *Helminthosporium maydis* sobre o milho e também quando evita as epidemias (ULLSTRUP, 1997).

O melhoramento genético dito como a forma mais racional de controle da doença mancha branca, tem encontrado problemas para a estabilidade nos sistemas de cultivo nas regiões do Brasil, devido à utilização de diversas variedades de híbridos de milho suscetíveis à doença (SOUZA; DUARTE, 2002; BRUNELLI et al., 2002; SILVA et al., 2004).

A resistência genética é referida como aquela onde o hospedeiro tem a capacidade de suportar o crescimento do patógeno, e para identificar o quão este suporta é necessário à compreensão de aspectos como a expressão da resistência, a herança (poligênica ou monogênica), a especificidade da resistência às raças do patógeno, os mecanismos de resistência (hipersensibilidade) (PARLEVLIET, 1997). No entanto, é verificado em estudos sobre herança quantitativa e qualitativa, sendo a primeira em maior proporção, por sofrer interferência do ambiente, o vigor e a idade da planta hospedeira e apresentar variedade resistente à severidade da moléstia (CAMARGO, 1995).

O emprego da resistência genética, sobretudo a resistência do tipo vertical (especificidade da resistência), pode ser bloqueado ou dificultado pela variabilidade

patogênica, que resulta numa acelerada adaptação do patógeno aos materiais (híbridos) do mercado (SCHUELTER et al., 2003).

Parlevliet e Van Ommeren (1998) propuseram que para se obter resistência mais durável é necessária a eliminação de plantas muito suscetíveis e muito resistentes, para uma melhor identificação dos genótipos com baixos níveis de severidade à doença, visualizando corretamente a resistência.

3- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em Casa de Vegetação na Universidade Federal de Uberlândia e no Laboratório de Virologia Vegetal e Fitopatologia (LAVIV) em Uberlândia – MG, no ano de 2010.

3.1 Isolamento e obtenção do inoculo

O isolamento da bactéria foi feito a partir de folhas de milho com os sintomas de lesões encharcadas. Fragmentos foliares foram descontaminados com álcool 50% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos e posterior lavagem em água destilada e esterilizada, os quais foram colocados sobre o meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) em placa de Petri, e incubados na estufa à temperatura 28 °C por 48 horas.

Os isolados de bactéria obtidos foram preservados e mantidos na coleção do Laboratório de Bacteriologia do ICIAG/UFU, sob os números UFU A18 e UFU B13, provenientes de Morrinhos (GO) e Planaltina (GO), respectivamente, os quais foram utilizados para avaliação da reação de infecção dos mesmos em híbridos de milho à infecção pelo mesmo.

3.2 Reações de hipersensibilidade

O teste de hipersensibilidade foi realizado em plantas de fumo (White Burley). O teste de reação de hipersensibilidade (HR) é utilizado na evidenciação da condição de uma determinada bactéria ser fitopatogênica ou não, obtendo-se uma resposta rápida e de fácil interpretação. A suspensão bacteriana foi inoculada por infiltração nos espaços entre nervuras laterais na face dorsal das folhas de fumo. A avaliação foi feita de 24 a 48 horas após a inoculação, observando a reação, caracterizada por necrose e dessecamento do tecido da região infiltrada (MARIANO et. al., 2000).

3.3 Caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados bacterianos

Para a identificação dos isolados bacterianos obtidos, eles foram caracterizados bioquímica e fisiologicamente pelos testes: Gram em KOH 3%, crescimento em meio YDC, oxidação ou fermentação da glicose, motilidade, produção de ácidos a partir da glicose de inositol, sorbitol, sacarose e D-arabinose, pela produção das enzimas arginina dihidrolase, liquefação da gelatina, oxidase, catalase e crescimento a 37 °C, (ANEXO A).

3.4 Teste de patogenicidade

Foram analisados cinco híbridos de milho, identificados como HA1, HA2, HB1, HB2 e HB3. Desses considera-se que HA1 e HA2 são resistentes e HB1, HB2 e HB3 suscetíveis à bactéria *Pantoea ananatis*, segundo a empresa Syngenta. Os híbridos de milhos foram cultivados em vasos de 500 g contendo substrato terra (Latossolo vermelho), areia grossa e vermiculita na proporção de 3:1:1, com 2 plantas por vaso. O teste de patogenicidade foi realizado quando as plantas estavam no estágio de desenvolvimento que apresentava de 3 a 4 folhas, com aproximadamente 15 a 20 dias após a semeadura. As plantas foram submetidas à câmara úmida 24 h antes e após a inoculação por aspersão, com uma suspensão bacteriana (10^{10} UFC/mL, $OD_{550} = 0,5$ nm). O experimento foi conduzido em delineamento experimental em blocos casualizados com seis repetições. Onde a unidade experimental constou de um vaso com duas plantas. O experimento foi montado em esquema fatorial 2 (isolados) x 5 (híbridos).

Foram feitas quatro avaliações, sendo a primeira realizada quatro dias após a inoculação. A severidade da mancha branca nas folhas foi avaliada através de uma escala de notas variando de 0 a 4, onde: 0 = folha sem sintoma, 1 = de 1 a 25% da folha lesionada, 2 = de 26 a 50% da folha lesionada, 3 = de 51 a 75% da folha lesionada, 4 = acima de 75% da folha lesionada (Figura 1). Para avaliação da reação das plantas foi considerada a avaliação realizada aos 8 dias após a inoculação.

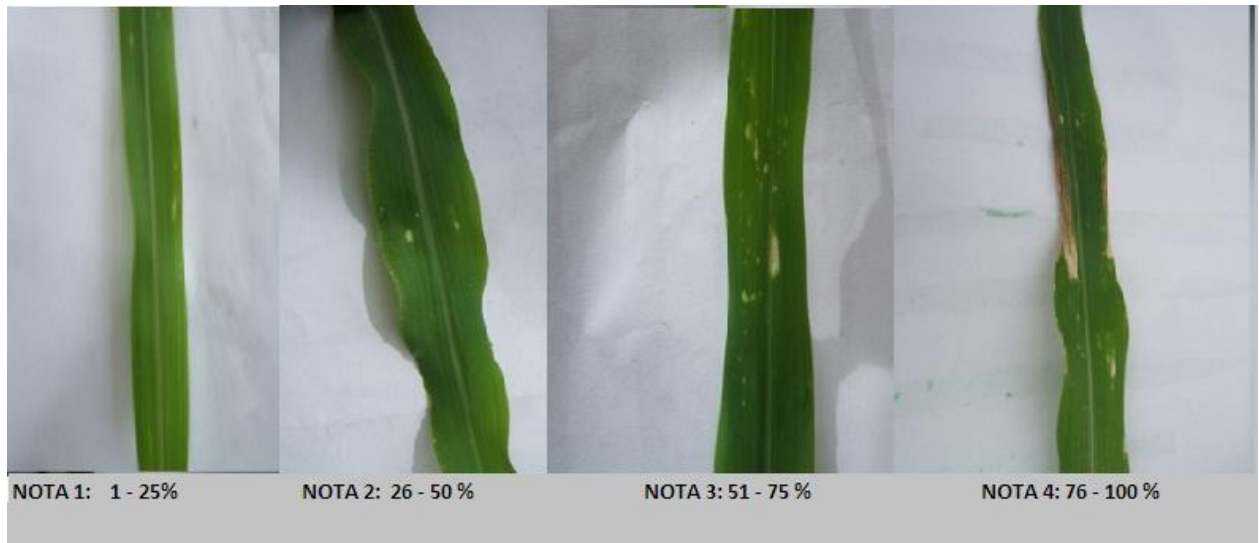


Figura 1. Escala de notas para avaliação da severidade da macha branca do milho.

A Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD) foi calculada pela fórmula: $AACPD = \sum((Y_i + Y_{i+1})/2)(t_{i+1} - t_i)$, onde Y representa a intensidade da doença, t o tempo e i o número de avaliações no tempo (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância através do teste de Tukey, a 0,05 de significância, por meio do programa estatístico SISVAR. Os valores de AACPD foram submetidos à transformação para $(\sqrt{x+0,5})$ (FERREIRA, 2008).

Para a avaliação de reação de híbridos de milho à *Pantoea ananatis* (Tabela 2), considerou uma escala de notas variando de 1 a 4, onde nota variando de 1 a 2 o híbrido foi considerado resistente e nota variando de 2,01 a 4 o híbrido foi considerado suscetível. Os valores utilizados foram a nota de avaliações obtida, durante o processo de avaliação.

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados bacterianos e reação de hipersensibilidade

Para a reação de hipersensibilidade em fumo os resultados foram positivos. Os isolados UFUA18 e UFUB13 foram testes caracterizados como: gram negativos, fermentação da glicose, colônias amarela em meio YDC, oxidase, catalase, arginina dihidrolase, produção de ácidos à partir do inositol, sorbitol, sacarose, D-arbinose, motilidade, liquefação da gelatina e crescimento a 37°C positivos (Tabela 1). De acordo com testes para a caracterização bioquímica, fisiológica e morfológica foi possível a identificação dos isolados UFU A18 e UFU B13 como *Pantoea ananatis*.

De acordo com Coplin e Kado (2001) isolado de *Pantoea ananatis* apresentaram resultados negativo para a reação de hipersensibilidade.

Tabela 1- Características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas de isolados da *Pantoea ananatis*. Uberlândia, MG, 2011.

Testes Bioquímicos	Isolados	
	UFU A18	UFU B13
GRAM	-	-
O/F	-	-
YDC (cor da colônia)	amarelas	amarelas
Oxidase	-	-
Catalase	+	+
Arginina dihidrolase	+	+
Produção de ácidos – Inositol	+	+
Produção de ácidos – Sorbitol	+	+
Produção de ácidos – Sacarose	+	+
Produção de ácidos – D- arabinose	+	+
Motilidade	+	+
Liquefação da gelatina	+	+
Crescimento a 37°C	+	+
Reação de hipersensibilidade (Fumo)	+	+

4.2 Reação de híbridos de milho à *Pantoea ananatis*

Na avaliação da reação de híbridos de milho à *Pantoea ananatis* (Tabela 2), o híbrido A1 apresentou maior resistência ao isolado UFU B13, enquanto que os demais híbridos foram suscetíveis aos dois isolados quando submetidos às inoculações bacterianas. O isolado UFU B13 apresentou menor agressividade que o isolado UFU A18 ao híbrido A1.

Tabela 2- Reação de híbridos de milho a *Pantoea ananatis*, após a inoculação por aspersão. Sendo os valores, a média das notas de avaliação.

Híbridos	Isolados	
	UFU A18	UFU B13
A1	3,55	1,22
A2	3,78	2,66
B1	3,94	2,72
B2	3,83	3,00
B3	3,94	3,83

Para a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha branca do milho (Tabela 3), não houve diferença significativa entre os híbridos testados quando inoculados com o isolado UFU A18. No entanto, para o híbrido A1 quando inoculado com o isolado UFU B13 houve uma menor AACPS diferindo estaticamente dos demais.

Tabela 3- Área abaixo da curva de progresso da severidade de mancha branca do milho para diferentes híbridos e dois isolados bacterianos. Uberlândia, MG, 2010.

Híbridos	Isolados	
	A18	B13
A1	6,25 aB	2,40 aA
A2	6,33 aA	5,54 bA
B1	6,43 aA	5,82 bA
B2	6,36 aA	5,80 bA
B3	6,40 aA	6,32 bA

DMS : 1,14

CV (%) : 17,04

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Portanto, os híbridos identificados como HA2, HB1, HB2 e HB3, não apresentaram diferenças significativas quanto os sintomas da mancha-branca do milho,

tanto para o isolado UFU A18 e UFU B13. Porém o híbrido HA1, considerado o mais resistente para o isolado bacteriano UFU B13, advindo de Planaltina (GO), apresentou diferença significativa.

Em condições controladas, Pacola-Meirelles et al.(2001) conseguiram confirmar e demonstrar o envolvimento da bactéria *Pantoea ananatis* como agente causal da mancha branca do milho, obtendo colônias de cor amarelada nos isolados utilizados.

5- CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos foram caracterizados e identificados como *Pantoea ananatis*.

Todos os híbridos foram suscetíveis aos isolados bacterianos UFUA18 e UFUB13, porém o híbrido A1 que apresentou maior resistência em comparação aos demais, quando inoculado com o isolado UFUB13.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BOMFETI, C.A. ET al. Microscopia de lesões da doença descrita no Brasil como Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, suplemento, p.235, 2004. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia , 37.,2004, GRAMADO –SC.

BOMFETI, C.A.; MEIRELLES, W.F.; SOUZA-PACCOLA, E.A.; CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; MARRIEL, I.E.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Avaliação de produtos químicos comerciais, *in vitro* e *in vivo* no controle da doença foliar mancha branca do milho, causada por *Pantoea ananatis*. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.63-67, 2007.

BONFETTI, C.A., SOUZA-PACCOLLA, E.A., MASSOLA JÚNIOR, N.S., MARRIEL, I.E., MEIRELLES, W.F., CASELA, C.R., PACCOLLA-MEIRELLES, L.D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.63-68, 2008.

BRUNELLI, K.F.; SILVA. H.P; CAMARGO,L.E.A. Mapeamento de genes de resistência a *Puccinia polysora* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.2, p.134-140.2002.

BRUTON, B. D.; WELLS, J. M.; LESTER, G. E.; PATTERSON, C. L. Pathogenicity and characterization of *Erwinia ananas* causing a post harvest disease of cantaloupe fruit. **PlantDisease**, v.75, p.180-183, 1991.

CAIRES, A.M., JULIATTI, F.C. & TEBALDI, N.D. 2010. Métodos de inoculação de *Pantoea ananas* em híbridos de milho. In: XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Cuiabá, **Tropical Plant Pathology**, v.35, 274 (Supl.).

CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: Bergamim-Filho, A; Kimati, H. Amorin. L. **Manual de Fitopatologia**. 3ªed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. v.1,p. 470-491.

CAMPBELL,C.L., e MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley Sons. 1990, 532 p.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. **Embrapa–Circular Técnica 83**, Embrapa, Sete Lagoas, MG, Brasil, 2006.

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

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento. **Série Histórica de Milho Total (1ª e 2ª safras)**: safras 1989/90 a 2010/11. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/MilhoTotalSerieHist.xls>>. Acesso : 15 de outubro, 2011.

COPLIN, D.L., KADO, C.I. Gram-negative bacteria: Pantoea. SCHAAD, N.W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul, A.P.S. (ed.) 2001.p.73-83.

FANTIN, G.M. Desenvolvimento de lesões da mancha de *Phaeosphaeria maydis* em plantas de milho inoculadas em diferentes idades. **Summa Phytopatologica**, v.25, p.38, 1999.

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

FERNANDES F.T., OLIVEIRA E. & PINTO N.F.J.A. Doenças do milho: seja o doutor de seu milho. **Arquivo do Agrônomo** v.2, p.21-24, 1994..

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1997. 26- 80p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 26).

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

GITAITIS, R. D.; GAY, J. D. First report of a leaf blight seeds talk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. **Plant Disease**, 81:1096, 1997.

INFOBIBOS, 2009. **Informações tecnológicas. Mancha de phaeosphaeria no milho**. Desenvolvido por Gisele Maria Fantim. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/Phaeosphaeria/index.htm>. Acesso: junho de 2010.

JOHN DEERE. **Milho: Estabilidade no curto prazo e no longo prazo**. Desenvolvida por Carlos Cogo. Consultoria Agroeconômica. Disponível em: <http://www.deere.com.br/pt_BR/ag/veja_mais/info_mercado/maize.html>. Acesso:Março de 2011.

KADO,C.I, HESKETT,M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology** v.60, p.969-976,1970.

LOPES, M.T.G., LOPES, R., BRUNELLI, K.R., SILVA, H.P., MATIELLO, R.R., CAMARGO, L.E.A. Controle genético da resistência à mancha-de-*Phaeosphaeria* em milho. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p. 605- 611 mai-jun, 2007.

MARIANO, R.L.R. Reações de hipersensibilidade a bactérias fitopatogênicas. In: Mariano, R.L.R. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p.65-66.

MARRIEL, I.E. et al. Análise quantitativa e metabólica da população bacteriana em lesões de mancha foliar de *Phaeosphaeria* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, suplemento, p.203, 2004. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 37, 2004, GRAMADO-SC.

MERGAERT, J, VERDONCK, L., KERSTERS, K. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, n.1, p. 162-173, 1993.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; FERREIRA, A.S.; MEIRELLES, W.F.; MARRIEL, I.E.; CASELA, C.R. Detection of a bacterium associated with a leafspot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 149, n. 5, p. 275-279, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; MEIRELLES, W.F.; PARENTONI, S.N.; MARRIEL, I.E.; FERREIRA, A.S.; CASELA, C.R. Reaction of maize inbred lines to a bacterium, *Pantoea ananas*, isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.2, n.4, p. 587-590, 2002.

PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa. CNPMS. p. 6, 2006. (Circular técnica, 75).

PARLEVLIET, J.E; VAN OMMEREN, A. Accumulation of partial resistance in barley leaf rust and powdery mildew through recurrent selection against susceptibility. **Euphytica**. Wageningen, v.37, p.261-274,1998.

PARLEVLIET, J.E. Present concepts in breeding for disease resistance private. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, suplemento, p 7-15, 1997.

PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CAMARGO, L.; Doenças do milho. In: KIMAT, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.(Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, v.2, p.477-488, 2005.

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

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Manual de identificação e controle de doenças em milho**. Passo Fundo: Aldeia. Norte, 1996,80p.

ROBBINSON, R.A. **Return to resistance: Breeding crops to reduce pesticide dependence**. Davis: Agaccess, 1996, 480p.

ROCHA, K.R. & PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Efeito do tamanho populacional de *Pantoea ananatis* na atividade de ice nucleation e reprodução dos sintomas da mancha branca do milho. In: XVIII ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Londrina. CD ROM, 2009.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, 2 ed., 2005 417p.

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**, v.2, n.1, p.80-86, 2003.

SERRANO, F.B. 1928. **Bacterial fruitlet brown-rot of pineapple in the Philippines**. Philippine J. Sci. 36:271–324.

SILVA, H.P. & MORO, J.R. 2004. Diallel analysis of maize resistance to *Phaeosphaeria maydis*. **Scientia Agricola**, 2004, v. 61, 36-42.

SOUZA, J. C. de; DUARTE, J. M. Reação de cultivares de milho à *Phaeosphaeria maydis*. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, n. 26, p. 325-331, 2002.

TRUPER, H., CLARI, L. Taxonomic note: Necessary correction of specific epithets formed as substantives (Nouns) “in apposition”. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n.3., p.908-909, 1997.

ULLSTRUP, A.J. Corn Diseases. In: SPRAGE, G.F. **Corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1997. p. 391-500.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. Jun./2010. Disponível em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 15 de outubro de 2011.

WATANABE, K.; KAWAKITA, H.; SATO, M. Epiphytic bacterium, *Erwinia ananas*, commonly isolated from rice plants and brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*) in hopperburn patches. **Applied Entomology and Zoology**, v.31, p.459-462, 1996.

WELLS, J. M.; SHENG, W. S.; CEPONIS, M. J.; CHEN, T. A. Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. **Phytopathology**, v.77, p.511-514, 1987.

ANEXO A

1.Oxidação ou Fermentação da Glicose

Indica se a bactéria tem um metabolismo fermentativo ou oxidativos.

Composição do meio (Hugh & Leifson):

Peptona - 2g

NaCl - 5g

K₂HPO₄ - 0,3g

Agar - 3g

Solução aquosa de Azul de Bromotimol a 1% - 3 mL

H₂O destilada - 1000 mL

Preparar o meio e ajustar o Ph para 7,1. Distribua 5 mL do meio em cada tubo de ensaio e esterilize em autoclave , mantendo sempre os tubos em posição vertical. Preparar uma solução aquosa de glicose a 10% e esterilize por filtração. Com o meio fundente, levar os tubos para a câmara de fluxo laminar e adicionar 0,5 ml da solução de glicose 10% em cada tubo (SHAAD,1988).

Procedimento:

Semear o meio com a bactéria oriunda de uma cultura com 24 a 48 horas de idade, com uma alça de platina aberta, bastando fazer uma perfuração do meio pela alça, para que seja feita a inoculação. Tomar cuidado para não deixar bolhas de ar no local da perfuração. Para cada bactéria serão inoculados dois tubos, onde em um deles se adicionará uma camada de 3 cm de óleo mineral esterilizado em autoclave, para que seja satisfeita a condição de anaerobiose (também podem ser utilizados parafina ou vaselina fundida).

Levam-se os tubos para a incubadora, à temperatura de 25 a 28 °C, Durante 1 a 3 dias.

Resultados:

Nos tubos onde houve crescimento bacteriano, haverá produção de ácido a partir da glicose, reduzindo o PH e fazendo com que o meio adquira coloração amarela, indicando um resultado positivo para o teste. A alteração verificada nos dois tubos onde a bactéria foi inoculada indica que houve crescimento na condição de aerobiose e de anaerobiose, caracterizando uma bactéria facultativa, com metabolismo fermentativo para carboidratos. Quando a oxidação é fraca ou demorada, uma reação inicial pode ser observada na superfície do tubo sem o óleo mineral, reação esta que pode persistir por vários dias até que o ácido seja produzido. Bactérias que não fermentam nem oxidam o carboidrato contido no meio, não produzem nenhuma mudança no tubo com óleo mineral, somente se observando uma reação alcalina no tubo sem óleo (MARIANO, 2000).

2. Produção de ácido a partir de diversas fontes de açúcares

Indica quais os açúcares que a bactéria consegue utilizar como fonte de Carbono.

Composição do meio (Meio C de Dye):

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 0,5 g

K_2HPO_4 – 0,5 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 g

Extrato de levedura – 1g

H_2O destilada – 1000 mL

Preparar uma solução de Púrpuro de Bromocresol a 1,5% em etanol e misturar 0,7 ml aos 1000 ml de meio. Ajuste o pH, que deverá estar a 6,8 e distribua 4,5 ml de meio em cada tubo de ensaio. Leve os tubos para autoclavagem, mantendo-os sempre na posição vertical. Prepare as soluções de cada açúcar a 5% e esterilize por filtração. Com o meio frio, leve os tubos para a câmara de fluxo laminar e adicionar 0,5 ml de cada açúcar a ser testado, em diferentes tubos, fazendo com que cada tubo contenha um açúcar diferente. (Dye,1968)

Açúcares a serem testado: Depende da bactéria, de acordo com os testes recomendados.

Procedimento:

Com uma alça de plantinha reta, pegar uma porção da colônia a ser testa e repicar para os tubos, bastando uma perfuração do meio, com a alça, para que seja feita a inoculação. É importante que se guarde um tubo de cada açúcar sem que tenha sido feita a inoculação (controle). Levam-se os tubos para a incubadora, aguardando um possível crescimento bacteriano.

Resultados:

As bactérias que utilizarem como fonte de carbono o açúcar contido no tubo onde foi inoculada irão liberar ácidos como metabólitos, acidificando o meio; o que poderá ser constatado pela “viragem” do indicado Púrpuro de Bromocresol, passando da cor azul para a amarela, podendo-se comparar com a coloração do tubo onde não foi feita a inoculação (controle).

3. Arginina dihidrolase

É utilizado para verificar se a bactéria em teste é capaz de produzir amônia a partir de arginina, na ausência de oxigênio (anaerobiose), tornando o meio alcalino. Teste utilizado à separação de isolados bacterianos do gênero *Pseudomonas*.

Composição do meio (meio 2A de Thornley):

Peptona – 1g

NaCl – 5g

K₂HPO₄ – 0,3 g

Agar – 3 g

Vermelho de fenol – 0,01 g

Arginina-Hcl – 10g

H₂O destilada – 1000 mL

Após o seu preparo, ajuste o pH para 7,2 e coloque 5ml de meio em cada tubo de ensaio com tampa de rosca, e autoclavar, deixando os tubos na posição vertical quando estiverem esfriando (THORNLEY, 1960).

Procedimento:

Semear o meio com a bactéria a ser testada com uma alça de platina aberta, bastando fazer uma perfuração do meio com a alça. Para cada bactéria serão testados dois tubos, onde em um deles se adicionará uma camada de 0,5 cm de óleo mineral esterilizado em autoclave, para que seja satisfeita a condição de anaerobiose (também podem ser utilizadas a vaselina líquida ou a parafina líquida); devendo-se guardar dois tubos, um com óleo mineral esterilizado e outro sem o óleo mineral (nestes tubos não deve ser feito o semeio (controle)). Levam-se os tubos para a incubadora, à temperatura de 27 a 28°C, observando por até 7 dias.

Resultados:

Nos tubos onde houve crescimento bacteriano, haverá uma reação alcalina, fazendo com que o indicador mude de cor, ficando rosa-escuro, indicando um resultado positivo para o teste. Se o meio contendo óleo mineral não sofreu alteração de coloração, o resultado será negativo (comparar se houve alteração de cor utilizando o tubo “controle”).

4. Liquefação da gelatina

Indica se a bactéria é capaz de digerir a gelatina.

Composição do meio:

Extrato de carne – 3g

Peptona - 5g

Gelatina (sem sabor) – 120 g

H₂O destilada – 1000 mL

Dissolver a gelatina em parte da água destilada aquecida e misturar os outros ingredientes no que restou da água destilada, juntando os dois preparados ao final. Colocar cerca de 5 ml do meio de gelatina em cada tubo. Após a autoclavagem, devem-se deixar os

tubos esfriarem na posição vertical imersos até a metade, em água com gelo, para verificar se a gelatina está realmente solidificando (FAHY; HAYWARD, 1983).

Procedimento:

Com uma alça de platina aberta, pegar uma porção da colônia a ser testada e repicar para os tubos, bastando uma perfuração do meio de gelatina pela alça, para que seja feita a inoculação, deve-se guarda um tubo sem ter sido feita a inoculação (controle). Levam-se os tubos para a incubadora, com 25 a 28°C, aguardando o crescimento bacteriano.

Resultados:

Avaliar a digestão da gelatina 3, 7 e 21 dias após a inoculação, colocando os tubos em geladeira por 30 min. Os tubos que contiverem colônia capazes de digerir a gelatina, apresentando o meio liquefeito após este período em refrigeração, podendo-se descartar estas colônias que obtiveram resultado positivo na digestão da gelatina; as demais devem voltar à incubadora até se completarem aos 21 dias de incubação. Caso não tenha liquefeito a gelatina após este período, deverão ser descartadas com resultado negativo para digestão. Deve-se manter sempre um tubo sem ter sido inoculada quaisquer bactéria (controle), podendo-se verificar ao longo do tempo de incubação a validade do meio; para isto sempre que se for colocar os tubos na geladeira, deve-se colocar o tubo “controle” juntamente, acompanhando sempre os tubos a serem testados.

5. Oxidase

Composição do meio (Agar nutriente):

Extrato de carne – 3 g

Peptona – 5 g

Glicose – 10 g

Agar – 15 g

H₂O destilada – 1000 mL

Ajustar o pH para 7,0, autoclavar e distribuir o meio esterilizado, em placas de Petri. Crescer as colônias da bactéria a ser testada neste meio, por 24h (Schaad,1988).

Materiais adicionais:

Papel de filtro

Tetrametil Parafenilenodiamino Dihidroclorato – solução a 1%

H₂O destilada

Preparar a solução do Tetrametil Parafenilenodiamino Dihidroclorato a 1%, em água destilada, utilizando somente a quantidade necessária para o teste, tomando muito cuidado já que este reagente é cancerígeno. Deve-se guardar o reagente puro sempre em congelador (SCHAAD, 1988).

Procedimento:

Com o auxílio de uma pinça, molhar o papel de filtro na solução de Tetrametil Parafenilenodiamino Dihidroclorato a 1%, e esfregar uma pequena porção da bactéria a ser testada, no papel tratado. A ponta de uma alça de platina é recomendada, uma vez que traços de ferro catalizam a oxidação do fenilenodiamino.

Resultados:

No caso de resultado positivo para o teste, o papel mudará da cor branca para roxa, em um intervalo de tempo menor que 10s, fracamente positivo se a coloração aparecer entre 10 a 60 segundos. SE o resultado for negativo, após 60s, o papel irá continuar branco.

6. Catalase

Evidencia-se a bactéria é capaz de produzir catalase, decompondo $2 \text{H}_2\text{O}_2$ em $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

a) Coloque uma pequena porção da colônia bacteriana crescida por 18 a 24h, obtida de um meio de cultura sólido (o meio não poderá conter sangue, nem extrato de carne), sobre uma lâmina de vidro.

b) Adicione algumas gotas de H₂O₂ (água oxigenada) a 3% sobre o fragmento da colônia bacteriana.

c) Observar preferencialmente em microscópio.

A produção de bolhas indica reação positiva para este teste (Klement et al.,1990).

7. Motilidade

Composição do meio:

Triptona – 10g

NaCl – 5g

Agár – 5 g

H₂O dest. – 1000 ml

Ajustar pH para 7,4, distribuir cerca de 5 ml do meio em cada tubo de ensaio e esterelizar em autoclave. Deixar solidificar em posição vertical.

Procedimento:

Semear o meio com a bactéria a ser testada com uma alça de platina aberta, bastando fazer uma perfuração do meio pela alça, para que seja feita a inoculação. Levam-se os tubos para a incubadora, à temperatura de 25-28°C, durante 12 a 24 horas.

Resultado:

A observação de um crescimento difuso, a partir do local onde a bactéria dói semeada, indica resultado positivo (+) para o teste.