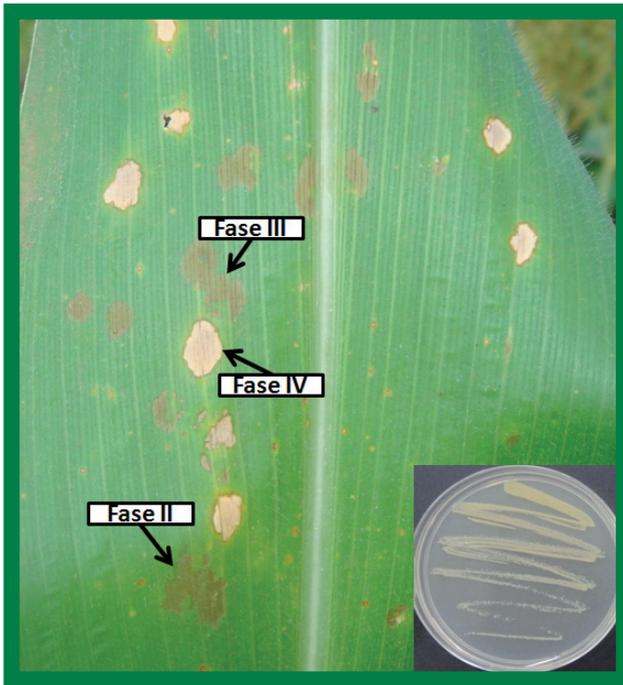


Mancha-foliar-de-*Phaeosphaeria* (mancha-branca-do-milho): Fungo ou Bactéria?



ISSN 1679-0154
Dezembro, 2013

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 79

Mancha-foliar-de- *Phaeosphaeria* (mancha- branca-do-milho): Fungo ou Bactéria?

Ricardo Marcelo Gonçalves
José Edson Fontes Figueiredo
Eliseu dos Santos Pedro
Walter Fernandes Meirelles
Rui Pereira Leite Junior
Aline Vanessa Sauer
Rodrigo Vêras Costa
Luciano Viana Cota
Dagma Dionísia da Silva
Luzia Doretto Paccola-Meirelles

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro,
Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda
de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Dagma Dionísia da Silva

1ª edição

1ª impressão (2013): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Mancha-foliar-de-Phaeosphaeria: fungo ou bactéria? / Ricardo
Marcelo Gonçalves ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho
e Sorgo, 2013.

36 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /
Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 79).

1. Doença de planta. 3. Milho. 3. *Pantoea ananatis*. I.
Gonçalves, Ricardo Marcelo. II. Série.

CDD 632.32 (21. ed.)

© Embrapa 2013

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	12
Resultados e Discussão	17
Agradecimentos	27
Referências	28

Mancha-foliar-de-*Phaeosphaeria* (mancha-branca-do-milho): Fungo ou Bactéria?

Ricardo Marcelo Gonçalves¹

José Edson Fontes Figueiredo²

Eliseu dos Santos Pedro³

Walter Fernandes Meirelles⁴

Rui Pereira Leite Junior⁵

Aline Vanessa Sauer⁶

Rodrigo Vêras Costa⁷

Luciano Viana Cota⁸

Dagma Dionísia da Silva⁹

Luzia Doretto Paccola-Meirelles¹⁰

Resumo

Diferentes espécies de fungos e a bactéria *Pantoea ananatis* (*Pa*) foram relatados como agentes etiológicos da doença mancha-de-*Phaeosphaeria* (MF) do milho. Este trabalho teve como objetivo a identificação molecular de fungos e bactérias que ocorrem em MF e sua etiologia. Os DNAs genômicos de 1) amostras de cada um dos quatro estágios das lesões MF;

¹Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Fitopatologia/Proteção de Plantas pela Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, gonalves.agrouel@gmail.com

²Biólogo, D.Sc. em Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, jose.edson@embrapa.br

³Graduando em Agronomia na Universidade Estadual de Londrina, Estagiário da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, eliseupedro@bol.com.br

⁴Engenheiro Agrônomo, M.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador da Embrapa e Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, walter.meirelles@embrapa.br

⁵Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Área de Proteção de Plantas do Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR, ruileite@iapar.br

⁶Engenheira Agrônoma, Doutoranda em Fitopatologia/Proteção de Plantas pela Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, alinevanessasauer@hotmail.com

⁷Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, rodrigo.veras@embrapa.br

⁸Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, luciano.cota@embrapa.br

⁹Engenheira Agrônoma, D.Sc em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, dagma.silva@embrapa.br

¹⁰Bióloga, Ph.D. em Fitopatologia, Professora Sênior da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, paccola@uel.br

2) bactérias e fungos isolados de lesões naturais (NPLS) e lesões artificial (AI), e 3) fungos isolados de lesões obtidas a partir de plantas inoculadas com *Pa* em casa de vegetação (GH) foram utilizados em reações de PCR com primers universais para genes rRNA de bactérias e fungos, e primers espécie-específicos para *Pa*. Amplicons bacterianos foram observados em todas as fases das lesões e amplicons fúngicos foram observados nos estádios 3 e 4. Amplicons bacterianos de amostras NPLS eram de *Pa* enquanto amplicons fúngicos foram de *Phaeosphaeria* sp. e *Phoma* sp. Bactérias nas NPLS, GH e lesões AI foram identificadas como *Pa*, *Pa* e *Bacillus subtilis*, respectivamente, enquanto os fungos foram *Epicoccum nigrum*, *Leptosphaeria sacchari*, *Cochliobolus geniculatus*, *Pithomyces chartarum*, *Alternaria alternata*, *A. ricini*, *Gibberella intricans*, *G. fujikuroi*, *Phaeosphaeria* sp. , *P. avenaria*, *Phoma* sp., *Phyllosticta* sp., *Sarocladium strictum*, *Glomerella graminicola* e *Cochliobolus heterostrophus*. Os resultados indicam fortemente que *Pa* é o agente causador da doença PLS do milho e que diferentes espécies de fungos oportunistas só aparecem no final das fases de necrose de lesões causadas por *Pa*.

Palavras-chave: mancha-de-feosféria, *Pantoea ananatis*, lesões naturais, lesões artificiais, fungos oportunistas, iniciadores espécie-específicos

Phaeosphaeria Leaf Spot (Maize White Spot): Fungus or Bacteria?

*Ricardo Marcelo Gonçalves*¹

*José Edson Fontes Figueiredo*²

*Eliseu dos Santos Pedro*³

*Walter Fernandes Meirelles*⁴

*Rui Pereira Leite Junior*⁵

*Aline Vanessa Sauer*⁶

*Rodrigo Vêras Costa*⁷

*Luciano Viana Cota*⁸

*Dagma Dionísia da Silva*⁹

*Luzia Doretto Paccola-Meirelles*¹⁰

Abstract

Different fungi species and the bacterium *Pantoea ananatis* (*Pa*) have been reported as etiological agents of *Phaeosphaeria* leaf spot (PLS) disease. This work aimed the molecular identification of fungi and bacteria occurring in PLS and its etiology. Genomic DNAs from 1) pool of each of the four stages of PLS lesions; 2) bacteria and fungi isolated from lesions of natural PLS (NPLS) and artificial injuries (AI); and 3) fungi isolated from lesions obtained from plants inoculated with *Pa* in greenhouse (GH) were used in PCR with universal primers for bacteria and fungal rRNA genes, and species-specific primers for *Pa*. Bacterial amplicons were observed at all stages of lesions and fungal amplicons in stages 3 and 4. Bacterial amplicons of pooled NPLS lesions were from *Pa* while fungal amplicons were from *Phaeosphaeria* sp. and *Phoma* sp. Bacteria from NPLS, GH and AI lesions were identified as *Pa*, *Pa* and *Bacillus subtilis*, respectively, while the fungi were *Epicoccum nigrum*, *Leptosphaeria sacchari*, *Cochliobolus geniculatus*, *Pithomyces*

chartarum, *Alternaria alternata*, *A. ricini*, *Gibberella intricans*, *G. fujikuroi*, *Phaeosphaeria* sp., *P. avenaria*, *Phoma* sp., *Phyllosticta* sp., *Sarocladium strictum*, *Glomerella graminicola*, and *Cochliobolus heterostrophus*. The results strongly indicate that *Pa* is the causal agent of the PLS disease of maize and that different species of opportunistic fungi only appear late in the necrotic stages of lesions caused by *Pa*.

Keywords: *Phaeosphaeria* leaf spot, *Pantoea ananatis*, natural lesions, artificial lesions, opportunistic fungi, species-specific primers.

Introdução

A doença foliar do milho conhecida como mancha-foliar-de-*Phaeosphaeria* (MFP), mancha-branca-do-milho (MBM) (REIS; CASA, 1996; BLUM et al., 2003), mancha-foliar-por-*Phaeosphaeria* (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997), feosferia (REIS; CASA, 1996) ou ainda pinta-branca (DUARTE et al., 1999) apresenta ampla distribuição geográfica, estendendo-se por toda a América do Sul e Central, Ásia e África (RANE et al., 1966; SHURTLEFF, 1984; CARSON et al., 1991; CASELA, 1998; CARSON, 1999).

A fase inicial da doença é caracterizada pelo surgimento de manchas verde-escuras, de aspecto encharcado, do tipo anasarcas típicas de lesões bacterianas, que posteriormente tornam-se necróticas, de coloração palha, espalhadas pela superfície foliar (RANE et al., 1966; SHURTLEFF, 1984; FANTIN, 1994; CARSON, 1999; PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001) (Figura 1). As lesões variam de circulares a elípticas, com 0,3 a 2 cm de diâmetro (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997; PACCOLA-MEIRELLES

et al., 1998; 1999), podendo coalescer e tornarem-se irregulares (PARENTONI et al., 1996; RANE et al., 1966). Estruturas reprodutivas fúngicas (peritécios e picnídios) podem se desenvolver no centro das lesões necróticas, nas fases tardias da doença (CASELA, 1998).

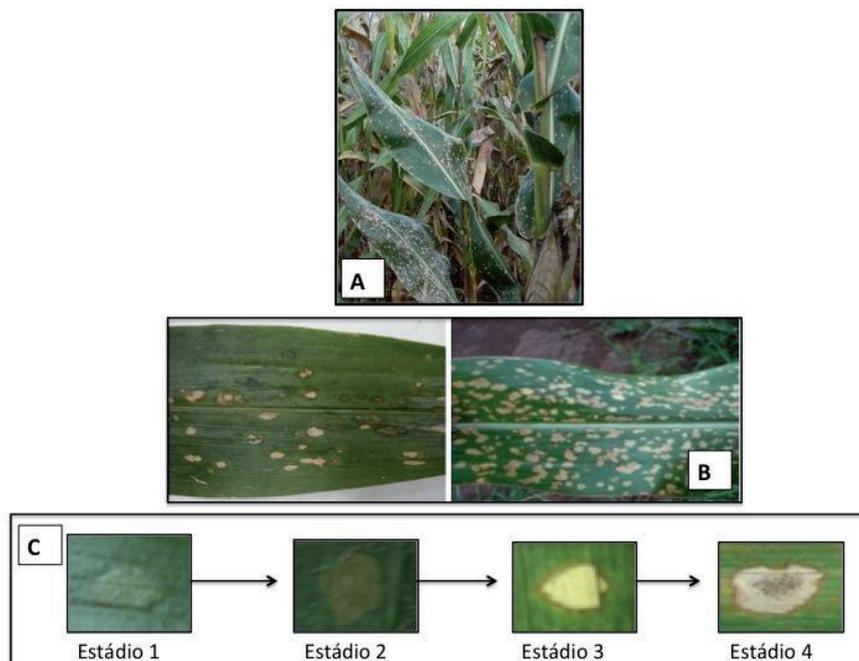


Figura 1. Sintomas da doença mancha-foliar-de-*Phaeosphaeria* (MFP)/mancha-branca-do-milho (MBM) em plantas cultivadas no campo. **A e B:** aspecto geral da doença em estádios avançados. **C:** lesões em diferentes estádios de desenvolvimento. Estádio 1: lesão anasarca, verde-escura, com aspecto encharcado; estágio 2: lesão acinzentada; estágio 3: lesão necrótica de coloração palha sem estruturas fúngicas visíveis; e estágio 4: lesão necrótica contendo estruturas fúngicas no centro (picnídios e peritécios).

A doença era descrita ocorrendo nas folhas inferiores, em suas porções distais, e iniciando os sintomas na época do florescimento (ARNY; NELSON, 1971; FERNANDES; OLIVEIRA, 1997). Hoje, no entanto, o ataque vem ocorrendo de forma alarmante em plantas jovens, sendo já observado no campo em culturas com 40 dias, podendo atingir a planta por completo. Em condições favoráveis, a doença causa sérios danos ao processo de enchimento de grãos levando à seca prematura da planta, com redução do ciclo e quedas acentuadas no tamanho e peso dos grãos (PINTO; FERNANDES, 1995; PINTO, 2004). Atualmente, a MFP é considerada a principal doença foliar do milho no Brasil e na África do Sul, com uma ampla distribuição ao longo de todas as áreas produtoras (FANTIN, 1994; FLETT et al., 1996; CASELA, 1998; KLOPPERS; TWEER, 2009; SIBIYA, 2009). Em muitos países, no entanto, a MFP é considerada de menor importância (CARSON, 1999). No Brasil, as perdas de rendimento podem ser superiores a 60%, e a gravidade da infecção é dependente da susceptibilidade das cultivares e das condições ambientais favoráveis (PINTO; FERNANDES, 1995). Nos Estados Unidos da América, perdas de rendimento de até 13% foram relatadas por Carson (2005).

Na última década, o agente etiológico desta importante doença do milho tem sido um assunto de muita controvérsia e discussão. O organismo causador da mancha-de-*Phaeosphaeria* do milho foi descrito inicialmente na Índia como sendo o fungo necrotrófico *Phaeosphaeria maydis* (Henn.) Rane, Payak e Renfro (sin. *Sphaerulina maydis* Henn.), Anamorfo *Phyllosticta* sp. (RANE et al., 1966). Desde então, várias publicações relataram a doença MFP no Brasil, e em todas elas, o fungo *P. maydis* foi descrito como seu agente causal, sem se considerar a necessidade de realizar o isolamento e a identificação do

patógeno, testes de patogenicidade ou postulados de Koch (FANTIN, 1994; SAWAZAKI et al., 1997; BRASIL; CARVALHO, 1998; PINTO, 2004). Inicialmente, o diagnóstico da doença no Brasil foi feito considerando-se apenas os aspectos visuais de lesões na planta em campo e descrições visuais de estruturas de reprodução sexuada e assexuada encontradas nas lesões da MFP (FANTIN, 1994). Ressalta-se que o ascomiceto *P. maydis* não tem sido encontrado de forma generalizada nas áreas de plantio de milho acometidas pela doença. Alguns autores relataram um baixo, ou até mesmo nulo, índice de isolamento do fungo *P. maydis* mesmo em áreas onde a incidência da doença é considerada alta (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; CERVELATTI et al., 2002; AMARAL et al., 2004; 2005; CARLI, 2008). Insucessos para reproduzir os sintomas da doença por meio da inoculação do fungo *P. maydis* em plantas de milho sob condições controladas foram relatados (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; CERVELATTI et al., 2002; AMARAL et al., 2005). Todas essas informações têm causado controvérsias sobre a etiologia da doença. Além disso, estruturas características de *P. maydis* (peritécios) ou *Phyllosticta* sp (picnídios) nem sempre podem ser encontrados nas lesões da MFP (PACCOLA-MEIRELLES et al., 1998; FERNANDES, 2004).

Em 2004, *Phoma sorghina* foi descrita como uma nova espécie de fungo associado à MFP (AMARAL et al., 2004). Em outro estudo (AMARAL et al., 2005), os fungos *P. sorghina*, *Phoma* sp. (Seção Plenodomus), *Phyllosticta* spp., e *Sporormiella* sp. foram postuladas como agentes causadores de sintomas da MFP. No entanto, a incidência de cada uma dessas espécies foi restrita a uma condição ambiental específica e variou de acordo com as regiões e estações do ano (AMARAL et al., 2005). Segundo esses autores, os resultados suportam a hipótese de que vários

patógenos estão envolvidos com os sintomas MFP e que as condições ambientais poderiam influenciar a predominância de um agente causal específico. Carli (2008) também relatou a ocorrência de *P. sorghina* e *Phoma* sp. associados com a MFP em seis ambientes diferentes, sendo que a espécie *P. sorghina* predominou em quatro locais e *Phoma* sp. mostrou-se muito frequente em dois deles.

Um organismo diferente, a bactéria *Pantoea ananatis*, isolada de lesões jovens da MFP, foi postulada como sendo o agente causador da doença (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). Plantas inoculadas com *P. ananatis* sob condições controladas reproduziram os sintomas típicos da doença entre 5 a 7 dias após a inoculação. Os autores confirmaram os postulados de Koch e sugeriram a denominação mancha-branca-do-milho em substituição a mancha-foliar-de-*Phaeosphaeria* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). Estudos posteriores sobre a etiologia da MFP foram inconclusivos, pois consideraram, separadamente, a bactéria ou os fungos presentes nas lesões da MFP (PINTO, 2004; BOMFETI et al., 2007, 2008; DUARTE et al., 2009).

Recentemente, a interação entre a bactéria *P. ananatis* e diferentes espécies de fungos foi proposta como necessária para a reprodução dos sintomas MFP (VIEIRA et al., 2009).

O conjunto de informações conflitantes sobre o agente causal da MFP aponta para a necessidade de estudos mais detalhados sobre essa doença. Em razão disso, no presente estudo, pela primeira vez, tanto a bactéria quanto os fungos presentes nas lesões da MFP foram considerados. Desta forma, a identidade molecular de espécies bacterianas e de fungos presentes nos

diferentes estádios de desenvolvimento das lesões MFP foi determinada, tanto em plantas cultivadas em campo como em casa de vegetação. Os organismos que colonizam as lesões naturais da MFP e lesões artificiais induzidas por danos com nitrogênio líquido em condições de campo foram identificados e comparados.

Material e Métodos

Quatro etapas visando à identificação molecular das espécies de bactérias e fungos associados com as lesões da mancha foliar de *Phaeosphaeria* foram conduzidos. Na primeira etapa, lesões em quatro diferentes estádios de desenvolvimento da doença, obtidas de plantas crescidas no campo, foram coletadas separadamente e, por meio de reações de PCR, foram identificadas, diretamente das lesões, as espécies bacterianas e fúngicas ali presentes. Na segunda etapa, folhas com sintomas da MFP foram coletadas de plantas de milho cultivado no campo e utilizadas para isolar e identificar bactérias e espécies de fungos associadas com os quatro estádios da lesão MFP. A terceira etapa constitui-se de um experimento que foi conduzido em casa de vegetação e teve como objetivo a reprodução de sintomas da MFP em plantas inoculadas com *P. ananatis*, o reisolamento da bactéria e isolamento e identificação molecular de espécies de fungos colonizadores das lesões pré-estabelecidas pela bactéria. A quarta etapa teve por objetivo comparar e identificar as espécies de fungos que colonizam lesões naturais da MFP e lesões necróticas, induzidas artificialmente pela queima das folhas com nitrogênio líquido, em plantas de milho crescidas no campo. Em cada etapa, todos os testes foram feitos duas vezes.

Caracterização e Amostragem de Lesões da MFP

Folhas de milho com sintomas da MFP foram coletadas de plantas crescidas no campo, na fase de pendoamento. As folhas foram lavadas com sabão neutro e secas com papel esterilizado. As lesões foram destacadas das folhas e classificadas em quatro estádios de desenvolvimento de acordo com a classificação feita por Paccola-Meirelles et al. (2001): estágio 1, manchas de coloração verde-escura e com aspecto molhado; estágio 2, lesões acinzentadas; estádios 3 e 4, lesões necrosadas de coloração palha sem e com estruturas fúngicas, respectivamente (Figura 1). Segmentos foliares assintomáticos foram usados como controle.

As amostras foram desinfestadas com álcool 70% (1 min), chloramine-T 2% (4 min), álcool 70% (30 s), fase essa seguida por três lavagens (30 s cada) com água destilada estéril (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 150 mg de tecido foliar de cada um dos quatro estádios da lesão empregando o método CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) e tampão de extração contendo PVPP 5% (Polyvinylpolypyrrolidone).

Isolamento de Microrganismos das Lesões da MFP

Folhas com sintomas da MFP foram coletadas de plantas de milho crescidas no campo em estágio de pendoamento. As lavagens e desinfestações foram feitas conforme descrição anterior. A água da última lavagem foi plaqueada no meio de cultivo trypticase soy agar (TSA), com a finalidade de testar a eficiência do procedimento de desinfestação. Segmentos individuais retirados individualmente das bordas das lesões (aproximadamente 1 cm), em estádios 1 e 2, foram colocados

em meio de cultura TSA e incubados à temperatura de 30 °C, com fotoperíodo de 48 h. Segmentos foliares contendo lesões no estágio 4, os quais apresentavam estruturas fúngicas (picnídios e peritécio), foram lavados com sabão neutro, secos com papel esterilizado e colocados em câmara úmida com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro, por 48 h. Para isolamento dos fungos, exudatos de picnídio e peritécio contendo esporos foram transferidos para meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados a 25 °C (± 2). Uma vez isolados, os fungos foram cultivados em Caldo Batata Dextrose, para a extração do DNA (aproximadamente 200 mg de massa micelial).

Reprodução dos Sintomas da MFP, Reisolamento da Bactéria *Pantoea ananatis* e Isolamento de Fungos em Condições de Casa de vegetação

A reprodução dos sintomas da MFP em casa de vegetação foi obtida com a inoculação da bactéria em plantas do híbrido HS200, suscetível à MFP. Foram usados três vasos, cada um contendo duas plantas. Uma suspensão bacteriana (1×10^6 CFU/ml) obtida de cultura pura crescida por 12 h a 30 °C, em meio TSB (Trypticase Soy Broth) foi inoculada por aspersão em folhas de milho levemente danificadas com uma esponja de lavar louças. As plantas controle foram aspergidas apenas com o meio de cultura TSB. As plantas inoculadas foram transferidas para câmara úmida durante 72 h e em seguida transferidas novamente para casa de vegetação a 30 °C e 70% de umidade relativa. Após o surgimento dos sintomas, a bactéria *P. ananatis* foi re-reisolada a partir de lesões com aspecto típico de “encharcamento” (estádio 1). As plantas inoculadas com a bactéria foram mantidas na casa de vegetação para evolução

das lesões para o estágio 4. Fungos foram isolados, a partir da extração dos picnídios/peritécios presentes nessas lesões, e identificados por meio de sequenciamento da região ITS dos genes rRNA.

Análise Comparativa de Fungos Isolados de Lesões Naturais e de Lesões Artificiais

Folhas de plantas de milho crescidas no campo foram lesionadas artificialmente com nitrogênio líquido. Lesões artificiais de aspecto semelhante ao estágio 1 das lesões da MFP foram marcadas e monitoradas por aproximadamente 30 dias. Trinta lesões necróticas, apresentando estruturas semelhantes a picnídios/peritécios, ou outras estruturas fúngicas, foram desinfestadas conforme descrito anteriormente, e as estruturas inoculadas em meio de cultura BDA e incubadas em temperatura de 25 °C (± 2). Os fungos isolados foram usados para identificação molecular.

Extração de DNA, Identificação Molecular e Análise dos Dados

DNA genômico total de lesões foliares foi extraído pelo método CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) modificado por Porebski et al. (1997). DNA genômico total da bactéria e do fungo foi extraído pelo método utilizado por Gürtler; Stanisich (1996) e pelo método usado por Shaolan et al. (2002), respectivamente. O gene 16S rRNA foi amplificado com os iniciadores universais para bactérias (GÜRTLER; STANISICH, 1996), "forward" 16F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e "reverse" 16R1542 (5'-AAGGAGGTGATCCAAGCCGCA-3'). A região intergênica ITS ("internal transcribed spacer") dos

genes 16S-23S rRNA de bactérias foi amplificada com os iniciadores espécie-específico desenhados para *P. ananatis* (FIGUEIREDO; PACCOLA-MEIRELES, 2012): ANAF (“forward”) (5'-CGTGAAACTACCCGTGTCTGTTGC-3') e ANAR (“reverse”) (5'-TGCCAGGGCATCCACCGTGTACGCT-3'). A região ITS dos genes ribossomais 18S-28S de fungos foi amplificada com os iniciadores universais (WHITE et al., 1990) “forward” ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e “reverse” ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). DNA genômico do fungo *Neurospora crassa* e cartões FTA (*fast technology for analysis of nucleic acids*) (Whatman Inc., Clifton, USA) contendo DNA preservado de culturas de linhagens de referência da bactéria *Pantoea ananatis* (PNA 08-2, PNA 97-5 e PNA 99-13) foram usados como controles positivos das reações de PCR. Reações de PCR sem DNA foram usadas como controles negativos. As reações de PCR foram realizadas em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research, MS, USA), com 25 ng de DNA genômico, 2.5 µl de tampão PCR 10X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 2.0 µM de cada iniciador 25 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, e 1 U de enzima Taq DNA polymerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brazil). O volume final da reação foi de 25 µl, sendo processado nas seguintes condições: um ciclo para desnaturação das amostras de DNA em temperatura de 94 °C por 1 min, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C (anelamento) e 1 min a 72 °C (extensão). No final, as reações foram incubadas por 10 min a 72 °C.

Os DNAs amplificados foram analisados por eletroforese horizontal a 6 V/cm² em géis de agarose a 1.0% (wt/v) em tampão TAE 1X (0.04 M Tris-Acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0) mais brometo de etídio (0.5 mg/l). Após a eletroforese, os géis foram visualizados em luz UV, fotografados, e os padrões

de amplificação foram comparados. Os amplicons foram cortados do gel e purificados com GeneClean kit II (BIO 101, Vista, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR bacterianos foram sequenciados, pelo menos duas vezes, em ambas as direções (“forward” e “reverse”) usando os iniciadores 16F518 e 16R928 (LANE, 1991). Os iniciadores 968F (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') e 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') desenhados por Nübel et al. (1996) foram usados, quando necessário. As reações de sequenciamento foram realizadas com o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, USA), em equipamento Applied Biosystems automatic sequencer ABI-377 (Applied Biosystems). As sequências foram geradas com os programas ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e CAP3 Program (HUANG; MADAN, 1999). As similaridades foram estabelecidas com o BlastN program (ALTSCHUL et al., 1997), considerando-se todas as sequências de DNA depositadas no GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências de nucleotídios de bactérias e fungos foram depositadas no EMBL/GenBank/DDBJ nucleotide sequence data libraries.

Resultados e Discussão

Neste estudo, os resultados de quatro testes diferentes forneceram fortes evidências sobre o agente causal da doença mancha-foliar-de-*Phaeosphaeria* do milho.

O primeiro experimento foi desenhado para identificar bactérias e fungos associados às lesões causadas pela MFP. Reações de PCR com iniciadores universais para bactérias, 27F e 1542R com o DNA genômico extraído de lesões em cada um dos quatro

estádios de desenvolvimento da MFP, produziram fragmentos de DNA de aproximadamente 1500 pb correspondendo ao gene 16S rRNA de bactéria em todos os quatro estádios da MFP. O sequenciamento dos quatro amplicons revelou 100% de identidade com o gene 16S rRNA de bactéria em todos os quatro estádios da MFP. O sequenciamento dos quatro amplicons revelou 100% de identidade com o gene 16S rRNA de *Pantoea ananatis* e 99% de identidade com outras espécies do gênero *Pantoea*. Além disso, o PCR usando o par de iniciadores ANAF/ANAR (FIGUEIREDO; PACCOLA-MEIRELLES, 2012) espécie-específico para a bactéria *P. ananatis* e o sequenciamento dos amplicons confirmaram a identidade da bactéria presente em todos os quatro estádios da doença como sendo a espécie *P. ananatis* (Figura 2a). Por outro lado, PCR usando os iniciadores universais ITS1 e ITS4 para fungos produziu amplicons apenas com os DNAs presentes nas lesões necróticas de estádios 3 e 4 da MFP (Figura 2b). O sequenciamento de cada amplicon e a pesquisa de similaridade com seqüências depositadas no GenBank database, usando o programa BLASTN, mostraram alta similaridade de seqüências (99-100%) com as espécies *Phoma* sp. e *Phaeosphaeria* sp.

Na segunda etapa, folhas com sintomas da MFP foram coletadas de plantas de milho em campo. Essas amostras foram utilizadas para isolamento de bactérias e fungos associados com a MFP. Nas lesões das fases iniciais da doença (estádios 1 e 2), colônias de bactérias de coloração amarela foram isoladas. O sequenciamento do DNA ribossomal 16S de 12 colônias amarelas confirmou a identidade dos isolados como sendo *Pantoea* sp. O PCR usando os iniciadores espécie-específico para *P. ananatis* (FIGUEIREDO; PACCOLA-MEIRELLES, 2012) e deu reações positivas para todos os isolados.

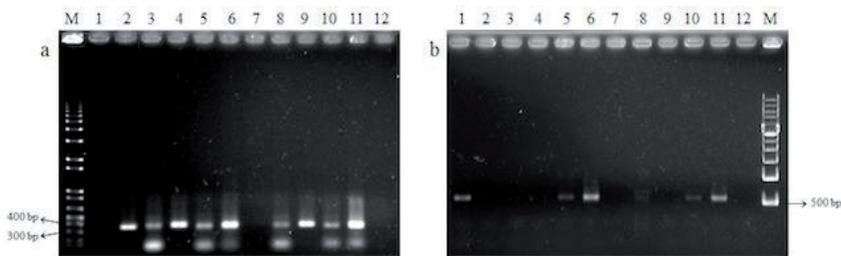


Figura 2. Gel de agarose dos produtos de PCR utilizando amostras de DNAs extraídos de lesões MFM em diferentes estádios de desenvolvimento. Amplicons obtidos com (a) iniciadores espécie-específicos (ANAF e ANAR) para *P. ananatis*; (b) iniciadores universais para amplificação da região ITS1 e ITS4 de fungos. Linhas 3: estágio 1 (“anasarca”); linhas 4: estágio 2 (lesões acinzentadas); linhas 5: estágio 3 (lesões necróticas sem estruturas reprodutivas de fungos); linhas 6: estágio 4 (lesões necróticas com estruturas reprodutivas de fungos); e linhas 7: tecido foliar assintomático. As linhas 1 e 2 são os controles negativo e positivo em (a) e os controles positivos e negativos em (b), respectivamente. As linhas M em a e b são dos marcadores moleculares 1 kb plus (Invitrogen) e 1 Kb *molecular marker* (Amresco), respectivamente. As linhas de 8 a 12 representam duplicatas das reações de PCR utilizando DNAs extraídos das amostras 3 a 7, respectivamente, e apresentadas na mesma ordem.

A maioria das lesões da fase necrótica (estádio 4) mostravam estruturas fúngicas (picnídio e peritécio) e 18 espécies de fungos foram isolados dessas lesões, de estádios 3 e 4. Os amplicons produzidos por PCR usando os iniciadores para a região ITS dos genes 18S/23S rRNA foram sequenciados, revelando diferentes espécies de fungos da ordem *Pleosporales*, depositadas no GenBank, com predominância da espécie *Epicoccum nigrum* (syn. *Phoma epicoccina*, Punith), seguida de *Leptosphaeria sacchari* (syn. *Phoma sorghina*; *Phoma* sp.; *Phaeosphaeria sacchari*), *Cochliobolus geniculatus* (syn. *Pseudocochliobolus geniculatus*), *Pithomyces chartarum*, *Alternaria alternata*, *Gibberella intricans* (syn. *Fusarium chlamydosporum* var. *fuscum*) e *Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi*. O grau de similaridade das diferentes sequências variou de 99-100%.

Na terceira etapa, a reprodução de sintomas da MFP em condições de casa de vegetação foi observada 10 dias após a inoculação das plantas de milho com a bactéria *P. ananatis*. Os sintomas da MFP foram similares aos sintomas observados no campo. As plantas controle não apresentaram sintomas da doença. Após alguns dias, as lesões iniciais com aspecto de encharcamento (estádio 1) progrediram para lesões necróticas com coloração de palha (estádios 3 e 4) (Figura 3). Em algumas lesões necróticas, como observado em campo, foi possível constatar a ocorrência de estruturas fúngicas (picnídios/peritécios). A partir destas estruturas, 14 fungos foram isolados das lesões e a identidade molecular foi comparada com os fungos isolados de lesões naturais de MFP. Os isolados foram identificados por sequenciamento direto dos produtos de PCR usando os iniciadores para a região ITS dos genes 18S/28S rRNA. O grau de similaridade de sequências variou

entre 99-100% com fungos de diferentes espécies da ordem *Pleosporales* depositadas no GenBank. Neste também a espécie predominante (68,75%) foi a *Epicoccum nigrum* (syn. *Phoma epicoccina*, Punith.), seguida de *Alternaria alternata* e *Alternaria ricini* (Sawada).

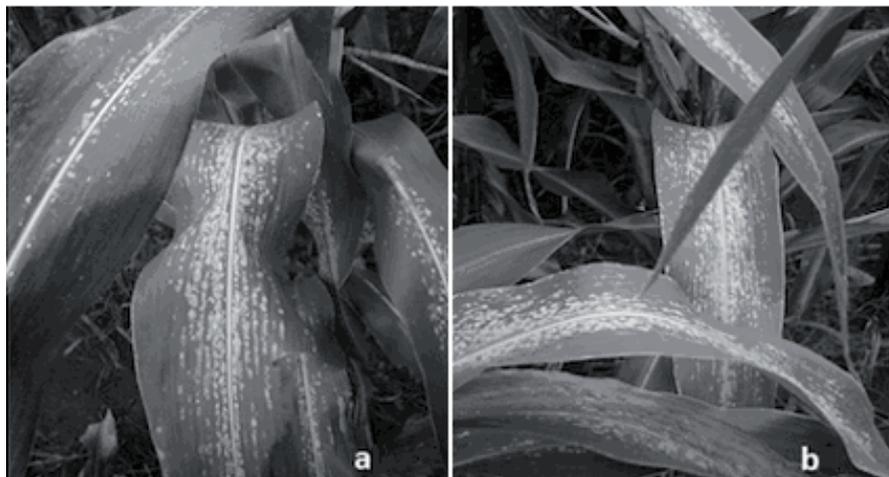


Figura 3. Teste de inoculação da bactéria *Pantoea ananatis* realizado em casa de vegetação. (a) híbrido BRHS200 e (b) híbrido DAS657, ambos suscetíveis à doença.

No quarto teste, trinta lesões necróticas, artificialmente induzidas por nitrogênio líquido, e sessenta lesões naturais da MFP, sendo trinta do estágio 1 e trinta do estágio 4, coletadas de plantas crescendo no mesmo campo e ao mesmo tempo, foram analisadas. A bactéria *P. ananatis* foi isolada de 28 das trinta lesões naturais da MFP (frequência de 0,93) em estágio 1 e a bactéria *Bacillus subtilis* foi isolada de duas, das trinta lesões artificiais (frequência de 0,067), induzidas pelo nitrogênio líquido. Sessenta e quatro fungos foram isolados das lesões naturais e das lesões artificiais. Fungos da ordem *Pleosporales*

(85,94%) foram identificados nas lesões naturais de MFP, nos estádios 3 e 4 (39,06%) e em lesões artificiais (46,88%). *Leptosphaeria sacchari* (syn: *Phoma sorghina*, *Epicoccum sorghinum*, *Phaeosphaeria sacchari*) foi o fungo mais frequente, tanto nas lesões naturais (18,75%) como nas lesões artificiais (23,44%).

A segunda espécie de fungo que mais prevaleceu nas lesões necróticas foi *Phaeosphaeria* sp. com as frequências de 12,5% em lesões naturais da MFP e 14,1% nas lesões artificiais, seguido de *Phoma* sp. com as frequências de 1,56% e 4,69% em lesões naturais e artificiais, respectivamente, e *Phyllosticta* sp. (3,2% em ambas, lesões naturais e artificiais). Outros fungos identificados nas lesões naturais e artificiais foram *Cochliobolus heterostrophus* (Pleosporales), com frequência de 4,69%, *Gibberella fujikuroi* (6,25%) e *Sarocladium strictum* (1,56%) da ordem Hypocreales, e *Glomerella graminicola* (6,25%) da ordem Glomerellales.

Embora a MFP do milho seja uma doença importante em muitos países, sua etiologia tem sido objeto de prolongado debate e controvérsia. Na literatura científica, diferentes espécies de fungos (RANE et al., 1966; CARSON et al., 1991; FANTIN, 1994; CARSON, 1999, 2005; AMARAL et al., 2004; 2005) e a bactéria *P. ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001) têm sido propostos como os agentes causadores desta doença. Além disso, a interação entre *Phaeosphaeria maydis* e *Pantoea ananatis* foi descrita como sendo necessária para o desenvolvimento da doença (VIEIRA et al., 2009). No presente estudo, quatro experimentos foram realizados para esclarecer pontos polêmicos, envolvendo a etiologia da doença MFP. Os

resultados demonstraram que a bactéria *Pantoea ananatis* é o agente causador da doença.

Após a etiologia da doença MFP do milho ter sido atribuída ao fungo *Phaeosphaeria maydis* (RANE et al., 1966), sintomas semelhantes da doença têm sido relatados como sendo causados pelo fungo *P. maydis*, sem que seja realizado o isolamento e a caracterização do patógeno (CARSON et al., 1991). O mesmo ocorreu no Brasil, desde a identificação da doença na década de 1990 (FANTIN, 1994; PINTO; FERNANDES, 1995; BRASIL; CARVALHO, 1998; PEGORARO et al., 2001; SOUZA; DUARTE, 2002; PINTO, 2004). Conforme foi destacado por Carson (1999), a maioria dos relatos sobre MFP é baseada apenas em observações visuais.

Existe um consenso entre os proponentes de *P. maydis*, ou de outras espécies fúngicas, como o agente etiológico da doença de que as estruturas fúngicas não estão presentes em todas as lesões da MFP e a frequência com que elas ocorrem varia de acordo com o clima e a região geográfica. *P. maydis* foi descrito em plantas de milho com alta incidência da doença apenas no Estado de São Paulo (FANTIN, 1994). Em vários estudos sobre identificação de fungos presentes nas lesões de MFP do milho cultivados em diferentes áreas do Brasil, o fungo *P. maydis* não foi encontrado (AMARAL et al., 2005; CARLI, 2008). Apenas dois outros estudos (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; AMARAL et al., 2004) relataram a presença de *P. maydis* em lesões da MFP, e mesmo assim a sua ocorrência foi muito baixa (10% e 7%, respectivamente).

A maioria dos autores que realizou a identificação de microrganismos em lesões MFP focou suas atenções apenas nas espécies de fungos (RANE et al., 1966; CARSON et al., 1991; FANTIN, 1994; AMARAL et al., 2004, 2005; CARSON, 2005; CARLI, 2008). Na verdade, os antibióticos, tais como neomicina e estreptomicina, são utilizados para prevenir o crescimento bacteriano durante o isolamento de fungos a partir das lesões da MFP (AMARAL et al., 2004; 2005; CARLI, 2008). Em contraste, a bactéria *P. ananatis* foi consistentemente isolada de lesões da MFP de milho em meio de cultivo, sem adição de antibióticos (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; BOMFETI et al., 2008; PÉREZ-Y-TERRÓN et al., 2009, ALIPPI; LÓPEZ, 2010; KRAWCZYK et al., 2010; FIGUEIREDO; PACCOLA-MEIRELLES, 2012; LANA et al., 2012).

Até a presente data, os postulados de Koch e a reprodução de sintomas de MFP em plantas infectadas com *P. maydis* sob condições controladas foram descritos apenas na Índia (RANE et al., 1966). Nos EUA, a infecção bem sucedida de plantas de milho com *P. maydis* cultivadas em sementes de sorgo, usado como veículo para as inoculações, foi reportada apenas no campo (CARSON, 1999, 2001, 2005). No Brasil, as tentativas de cumprir os postulados de Koch e a reprodução dos sintomas da MFP em plantas infectadas com *P. maydis* consistentemente falharam (PINTO; FERNANDES, 1995; FERNANDES; OLIVEIRA, 1997; CASELA, 1998; PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; CERVELATTI et al., 2002; CARLI, 2008).

Outro fato que chama a atenção no diagnóstico da doença é a descrição de outras espécies de fungos (*Phoma sorghina*, *Phoma* sp. (Seção Plenodomus), *Phyllosticta* spp., e *Sporormiella* sp.) como as responsáveis por sintomas similares

aos causados pela MFP (AMARAL et al., 2004, 2005; CARLI, 2008). No entanto, os sintomas de inoculações fúngicas apresentados por Amaral et al. (2005) são muito diferentes dos verdadeiros sintomas da MFP. Amaral et al. (2005) e Carli (2008) postularam que a doença MFP é causada por um complexo de fungos e que tanto as condições ambientais como a região onde está localizada a cultura, poderiam influenciar a predominância de um ou outro fungo. No presente estudo, diferentes espécies fúngicas da ordem Pleosporales, e de outras diferentes ordens, também foram isoladas a partir de lesões foliares da MFP, coletadas de plantas de milho cultivadas em diferentes regiões e climas. Desta forma, reforçamos que as diferentes espécies fúngicas descritas como agentes causais da MFP são espécies oportunistas que se instalam nas lesões pré-existentes e não representam espécies responsáveis pelos sintomas da MFP ou por sintomas similares. Diferentemente, a bactéria *P. ananatis* foi sempre isolada das lesões da MFP indiferentemente da região ecogeográfica ou das condições climáticas.

A forma de progressão da doença MFP é outra fonte de mal-entendidos. A doença MFP do milho tem pelo menos quatro etapas bem definidas de desenvolvimento (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; BOMFETI et al., 2008). Na primeira fase da doença (estádio 1), as lesões têm o aspecto de manchas foliares encharcadas (Figura 1). No estágio seguinte, a cor das lesões muda para verde escuro-castanho (estádio 2) e depois progride para a cor palha por causa da falta de clorofila nos tecidos lesionados (estádios 3 e 4). Nos três primeiros estádios de desenvolvimento, estruturas reprodutivas fúngicas não são vistas nas lesões. Estruturas reprodutivas fúngicas podem ser visualizadas somente no último estágio sem que, no entanto,

haja constância em todas as lesões. A predominância de *Pananatis* em lesões de estádios iniciais (1 e 2), e a prevalência de diferentes espécies fúngicas em lesões de estádios mais avançados (3 e 4) têm sido descritas como uma característica da doença MFP (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; BOMFETI et al., 2008). O mesmo foi observado nos resultados obtidos dos experimentos 1, 2 e 3, com prevalência de *P. ananatis* em lesões de estádios iniciais, e ocorrência de diferentes espécies fúngicas em lesões de estádios mais avançados.

Segundo Vieira et al. (2009), uma explicação para a ocorrência de *P. ananatis* juntamente com diferentes espécies fúngicas nas lesões da MFP seria a possibilidade de uma interação mútua entre eles, ou entre *P. maydis*/*P. ananatis*, e que essa interação seria necessária para o desenvolvimento da doença MFP. No entanto, os resultados aqui obtidos não apontam para a ocorrência de tal interação, visto que diferentes espécies de fungos, incluindo aquelas descritas por alguns autores como o agente causal da MFP, foram isoladas a partir de lesões necróticas provocadas artificialmente com nitrogênio líquido, indicando que a presença da bactéria *P. ananatis* não é necessária para o crescimento daquelas espécies fúngicas. Além disso, as espécies de fungos observadas nas lesões naturais da MFP e nas lesões artificiais foram isoladas com frequências semelhantes, indicando que as identificadas neste estudo simplesmente colonizam tecidos mortos de folhas de milho, não importando a sua origem.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que 1) a bactéria *P. ananatis* está presente desde os primeiros estádios de desenvolvimento das lesões da MFP enquanto diferentes espécies de fungos aparecem apenas em lesões de estágio

avançado; 2) contrariamente ao que foi observado com as diferentes espécies fúngicas, o isolamento de *P. ananatis* de lesões da MFP é independente da região ou do clima; 3) inoculação de *P. ananatis* em plantas de milho, sob condições controladas, produziram sintomas semelhantes aos de MFP; e 4) o crescimento de diferentes espécies fúngicas encontradas frequentemente em lesões naturais da MFP, incluindo algumas descritas como o agente causal da doença, ocorre também em lesões artificiais. Esse conjunto de resultados comprova que a doença MFP de milho é causada pela bactéria *Pantoea ananatis*, conforme foi postulado por Paccola-Meirelles et al. (2001), e não por uma espécie específica de fungo ou mesmo por um complexo de espécies fúngicas, conforme relatado anteriormente (RANE et al., 1966; CARSON et al., 1991; FANTIN, 1994; AMARAL et al., 2004, 2005; CARSON, 2005; CARLI, 2008). Há autores (FANTIN, 2009, 2010) que afirmam ser a doença mancha-branca-do-milho descrita por Paccola-Meireles et al. (2001) e causada pela bactéria *P. ananatis* diferente da doença descrita por Rane et al. (1966), Carson et al. (1991), Fantin (1994) e Fernandes (2004). Contudo, estudos anteriores a este, e acrescidos dos resultados aqui apresentados, comprovam tratar-se da mesma doença, portanto, causada apenas por um agente etiológico: a bactéria *Pantoea ananatis*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, à Fundação Araucária, Capes, Universidade Estadual de Londrina e Embrapa pelos suportes técnicos e financeiros.

Referências

- ALIPPI, A. M.; LÓPEZ, A. C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 487, 2010.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search program. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMARAL, A. L.; DAL SOGLIO, F. K.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F. Pathogenic fungi causing symptoms similar to *Phaeosphaeria* Leaf Spot of maize in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 8, p. 44-49, 2005.
- AMARAL, A. L.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F.; DAL SOGLIO, F. K. *Phoma sorghina*, a new pathogen associated with *Phaeosphaeria* leaf spot on maize in Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 53, p. 259, 2004.
- ARNY, D. C.; NELSON, R. R. *Phyllosticta maydis* species nova, the incitant of yellow leaf blight of maize. **Phytopathology**, Ithaca, v. 61, p. 1170-1172, 1971.
- BLUM, L. E. B.; UESUGI, C. H.; SILVA, D. D.; JESUS, A. A.; SILVA, C. S.; DUTRA, J. B.; FREITAS, L. F.; LOPES, L. F.; SENA, M. C.; LIMA, N. H. Doenças fúngicas mais frequentes do milho e sorgo em Brasília, DF. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 201-202, 2003. Edição dos resumos do 36º Congresso Brasileiro de Fitopatologia.

BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; MASSOLA, N. S.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 1-6, 2008.

BOMFETI, C. A.; MEIRELLES, W. F.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; MARRIEL, I. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Evaluation of commercial chemical products, *in vitro* and *in vivo* in the control of foliar disease, maize white spot, caused by *Pantoea ananatis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 63-67, 2007.

BRASIL, E. M.; CARVALHO, Y. Comportamento de híbridos de milho em relação a *Phaeosphaeria maydis* em diferentes épocas de plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 1977-1981, 1998.

CARLI, M. L. **Etiological and epidemiological aspects of the maize white leaf spot complex**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CARSON, M. L. Yield loss potential of phaeosphaeria leaf spot of maize caused by *Phaeosphaeria maydis* in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 986-988, 2005.

CARSON, M. L. Inheritance of resistance to phaeosphaeria leaf spot of maize. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 798-800, 2001.

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

CARSON, M. L.; GOODMAN, M. M.; GLAWE, D. A. Phaeosphaeria leaf spot of maize in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 968, 1991.

CASELA, C. R. The phaeosphaeria leaf spot. In: CASELA, C. R.; RENFRO, R.; KRATTIGER, A. F. (Ed.). **Diagnosing maize diseases in Latin America**. Ithaca: ISAAA; Brasília: Embrapa, 1998. p. 15-17. (ISAAA-Briefs, 9).

CERVELATTI, E. P.; PAIVA, E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; TEIXEIRA, F. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of phaeosphaeria leaf spot in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, p. 30-37, 2002.

DUARTE, R. P.; JULIATTI, F. C.; FREITAS, P. T. Efficacy of different fungicides on maize crop. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, p. 101-111, 2009.

DUARTE, J. M.; SOUZA, J. C.; CORTE, H. R. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis*. In: REUNION LATINOAMERICANA DEL MAIZ, 18., 1999, Sete Lagoas. **Memorias...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1999. p. 405-411.

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

FANTIN, G. M. **Mancha de *Phaeosphaeria* do milho**. São Paulo: Instituto Biológico, 2009. (Instituto Biológico. Comunicado Técnico, 107). Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=107>. Acesso em: 23 maio 2013.

FANTIN, G. M. Mancha de *Phaeosphaeria* em milho causada por fungo. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, p. 6-8, 2010.

FERNANDES, F.T. Mancha por *Phaeosphaeria* em milho. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (Ed.). **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, 2004. p. 268-276.

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

FIGUEIREDO, J. E. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Simple, rapid and accurate PCR-based detection of *Pantoea ananatis* in maize, sorghum and *Digitaria* sp. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 94, p. 663-667, 2012.

FLETT, B. C.; BENSCH, M. J.; SMIT, E.; FOURIE, H. **A field guide for identification of maize diseases in South Africa**. Potchefstroom: ARC-LNR, 1996.

GÜRTLER, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria by using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, London, v. 142, p. 3-16, 1996.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, New York, v. 9, p. 868-877, 1999.

KLOPPERS, R.; TWEER, S. **Maize diseases: *Phaeosphaeria* leaf spot**. Greytown: PANNAR Seed, 2009. Disponível em: <<http://www.plantwise.org/FullTextPDF/2011/20117800336.pdf>>. Acesso em: 22 maio 2013.

KRAWCZYK, K.; KAMASA, J.; ZWOLINSKA, A.; POSPIESZNY, H. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 92, p. 807-811, 2010.

LANA, U. G. P.; GOMES, E. A.; SILVA, D. D.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; SOUZA, I. R. P.; GUIMARÃES, C. T. Detection and molecular diversity of *Pantoea ananatis* associated with white spot disease in maize, sorghum and crabgrass in Brazil. **Journal Phytopathology**, Malden, v. 160, p. 441-448, 2012.

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

NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus*

polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; 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 Applied Biotechnology**, Londrina, v. 2, p. 587-590, 2002.

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**, Malden, v. 149, p. 275-279, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 314-315, 1999.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MEIRELLES, W. F.; CERVELATTI, E. P.; MAKI, C. S.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F.T.; FERREIRA, A. S. Caracterização morfológica das lesões da mancha foliar por *Phaeosphaeria* em híbridos de milho e avaliação da incidência do estágio sexuado e assexuado do patógeno. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., 1998, Recife. **Globalização e segurança alimentar**: resumos. Recife: IPA, 1998. 1 CD-ROM.

PARENTONI, S. N.; FERNANDES, F.T.; GAMA, E. E. G.; LOPES, M. A.; GUIMARÃES, P. E. P.; SANTOS, M. X.; SILVA, A. E. Efeito de níveis de nitrogênio sobre a severidade da doença foliar causada por *Phaeosphaeria maydis* em milho. In: CONGRESSO

NACIONAL DE MILHO E SORGO, 21., 1996, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1996. p. 164.

PEGORARO, D. G.; VACARO, E.; NUSS, C. N.; SOGLIO, F. K.; SERENO, M. J. C. M.; NETO, J. F. B. Efeito de época de semeadura e adubação na mancha-foliar de *Phaeosphaeria* em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 1037-1042, 2001.

PÉREZ-Y-TERRÓN, R.; CUELLAN, A.; MUÑOZ-ROJAS, J.; CASTAÑEDA-LUCIO, M.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; BAUTISTA-SOSA, L.; MUNIVE, J. A.; CAICEDO-RIVAS, R.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spots disease of maize, in Mexico. **Australasia Plant Disease Notes**, Brisbane, v. 4, p. 96-99, 2009.

PINTO, N. F. J. A. Controle químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, p. 134-138, 2004.

PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F.T. Avaliação de fungicidas no controle da mancha foliar de milho causada por *Phyllosticta* sp. (*Phaeosphaeria maydis*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 333, 1995.

POREBSKI, S.; BAILEY, L. G.; BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 15, p. 8-15, 1997.

RANE, M. S.; PAYAK, M. M.; RENFRO, B. L. The *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Indian Phytopathological Society Bulletin**, New Delhi, v. 3, p. 7-10, 1966.

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

SAWAZAKI, E.; DUDIENAS, C.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; GALVÃO, J. C. C.; CASTRO, J. L.; PEREIRA, J. Reação de cultivares de milho à mancha de *Phaeosphaeria* no estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 585-589, 1997.

SHAOLAN, L.; BIN, Z.; LIYUAN, Y.; ZHIYING, L.; QI, Z.; YOUWEI, C. An improved method for extracting fungal DNA. **Journal of Yunnan University**, Yunnan, v. 24, p. 471-472, 2002.

SHURTLEFF, M. C. *Phaeosphaeria* leaf spot. In: SHURTLEFF, M. C. (Ed.). **Compendium of corn diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1984. p. 23-24.

SIBIYA, J. **Breeding investigations for resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot (PLS) and other important foliar diseases and study of yield stability in African maize germplasm**. 2009. Tese (Doutorado) - University of Kwa-Zulu Natal, Pietermaritzburg, Republic of South Africa.

SOUZA, J. C.; DUARTE, J. M. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis*. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 325-331, 2002.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VIEIRA, R. A.; TESSMANN, D.; SCAPIM, C. A.; HATA, F. T.; RODOVALHO, M. A.; BARRETO, R. R. Genetic resistance of new popcorn hybrids to foliar diseases. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 9, p. 140-146, 2009.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

