

## Patogenicidade de *Pantoea ananatis* e *Phaeosphaeria maydis* em Plantas de Milho



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 83***

## ***Patogenicidade de *Pantoea ananatis* e *Phaeosphaeria maydis* em Plantas de Milho***

Rodrigo Vêras Costa  
Luciano Viana Cota  
Dagma Dionísia da Silva  
José Edson Fontes Figueiredo  
Carlos Roberto Casela  
Fabrício Eustáquio Lanza  
Laércio Zambolim  
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](http://www.cnpms.embrapa.br)  
E-mail: [cnpms.sac@embrapa.br](mailto: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: Rodrigo Veras da Costa

**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**

---

Patogenicidade de *Pantoea ananatis* e *Phaeosphaeria maydis* em  
plantas de milho / Rodrigo Veras da Costa ... [et al.]. – Sete  
Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2013.

26 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa  
Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 83).

1. Doença de planta. 3. Fungo. 3. Bactéria. 4. *Zea mays*. I.  
Costa, Rodrigo Veras da. II. Série.

CDD 632.32 (21. ed.)

---

© Embrapa 2013

# Sumário

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| <b>Resumo</b> .....                 | 4  |
| <b>Abstract</b> .....               | 6  |
| <b>Introdução</b> .....             | 7  |
| <b>Material e Métodos</b> .....     | 10 |
| <b>Resultados e Discussão</b> ..... | 16 |
| <b>Conclusões</b> .....             | 20 |
| <b>Agradecimentos</b> .....         | 20 |
| <b>Referências</b> .....            | 20 |

# Patogenicidade de *Pantoea ananatis* e *Phaeosphaeria maydis* em Plantas de Milho

---

**Rodrigo Vêras Costa<sup>1</sup>**

**Luciano Viana Cota<sup>2</sup>**

**Dagma Dionísia da Silva<sup>3</sup>**

**José Edson Fontes Figueiredo<sup>4</sup>**

**Carlos Roberto Casela<sup>5</sup>**

**Fabício Eustáquio Lanza<sup>6</sup>**

**Laércio Zambolim<sup>7</sup>**

**Luzia Doretto Paccola Meirelles<sup>8</sup>**

## Resumo

Mancha-branca-do milho (MBM), também conhecida como mancha-de-feosféria (MF), tornou-se uma das mais importantes doenças do milho no Brasil. A etiologia da MBM/MF permanece objeto de controvérsia e debate. Este estudo teve como objetivo testar o fungo *Phaeosphaeria maydis* e a bactéria *Pantoea ananatis* como agentes causadores da doença MBM/MF. As

---

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, rodrigo.veras@embrapa.br

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, luciano.cota@embrapa.br

<sup>3</sup>Engenheira Agrônoma, D.Sc em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, dagma.silva@embrapa.br

<sup>4</sup>Biólogo, D.Sc. em Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, jose.edson@embrapa.br

<sup>5</sup>Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Fitopatologia, Pesquisador aposentado da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, caselacarlos@hotmail.com

<sup>6</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, falanza@bol.com.br

<sup>7</sup>Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Professor Titular na Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, MG, zambolim@ufv.br

<sup>8</sup>Bióloga, Ph.D. em Fitopatologia, Professora Sênior da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, paccola@uel.br

bactérias isoladas a partir de plantas com sintomas foram identificadas pelos métodos morfológicos e moleculares. A identidade dos isolados bacterianos foi confirmada por primers específicos da espécie *P. ananatis*. O fungo *P. maydis* foi isolado a partir de plantas do híbrido comercial DAS657 sensível a MBM/MF. Plantas de DAS657 foram inoculadas com *P. ananatis* (HR+) e *P. maydis* em casa de vegetação. Plantas inoculadas com *P. ananatis* reproduziram sintomas típicos da doença MBM/MF e *P. ananatis* foi consistentemente reisolada das lesões. Para *P. maydis*, dois procedimentos diferentes foram testados: suspensões com  $10^4$  pseudotécios/ml e discos miceliais (1 cm de diâmetro) inoculados em plantas no estágio de 8 a 10 folhas. Várias tentativas para cumprir os postulados de Koch com *P. maydis* falharam. Estes resultados reforçam as evidências de que a bactéria *Pantoea ananatis* é o agente causador da doença MBM/MF do milho.

**Palavras-chave:** mancha-foliar-de-feosféria; mancha-branca-do-milho; postulado de Koch; *Pantoea ananatis*, *Phaeosphaeria maydis*; etiologia.

# Pathogenicity of *Pantoea ananatis* and *Phaeosphaeria maydis* Against Maize Plants

---

Rodrigo Véras Costa<sup>1</sup>

Luciano Viana Cota<sup>2</sup>

Dagma Dionísia da Silva<sup>3</sup>

José Edson Fontes Figueiredo<sup>4</sup>

Carlos Roberto Casela<sup>5</sup>

Fabício Eustáquio Lanza<sup>6</sup>

Laércio Zambolim<sup>7</sup>

Luzia Doretto Paccola Meirelles<sup>8</sup>

## Abstract

Maize white spot (MWS), also known as *Phaeosphaeria* leaf spot (PLS), has become one of the most important diseases of corn in Brazil. The etiology of MWS/PLS remains subject of controversy and debate. This study aimed to test the fungus *Phaeosphaeria maydis* and the bacterium *Pantoea ananatis* as causative agents of the MWS/PLS disease. Bacteria isolated from symptomatic plants were identified by morphological and molecular methods. The identity of the bacterial isolates was confirmed by species-specific primers for *P. ananatis* identification. The fungus *Phaeosphaeria maydis* was isolated from plants of the commercial hybrid DAS657 susceptible to MWS/PLS disease. Plants of DAS657 were inoculated with *P. ananatis* (HR+) and *P. maydis* in the greenhouse. Plants inoculated with *P. ananatis* reproduced typical symptoms of the natural MWS disease and *P. ananatis* was reisolated from typical water-soaked lesions. For *P. maydis*, two different procedures were tested: suspensions with 10<sup>4</sup> pseudothecia/ml and mycelia

discs (1 cm diameter) inoculated into the leaf whorls of plants at the 8 to 10 leaf stage. Several attempts to fulfill Koch's postulates with *P. maydis* consistently failed. These results strengthen the evidences that *Pantoea ananatis* is the causative agent of MWS/PLS disease of corn.

**Keywords:** *Phaeosphaeria* leaf spot; Maize white spot; Koch's postulates; *Pantoea ananatis*, *Phaeosphaeria maydis*; etiology.

## Introdução

A mancha-branca-do-milho (MBM), também conhecida como mancha-de-*Phaeosphaeria*, é uma das mais importantes doenças da cultura do milho no Brasil. A doença é endêmica e sua severidade tem aumentado significativamente a partir da década de 1990, podendo ser encontrada hoje em praticamente todas as regiões brasileiras onde o milho é cultivado (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997; FANTIN, 1994). Nos últimos anos, ela tem ocorrido em elevada severidade em outros países (CARSON, 1999; POMINI et al., 2007; PÉREZ-Y-TERRÓN et al., 2009; ALIPPI; LÓPEZ, 2010; CAPUCHO et al., 2010; KRAWCZYK et al., 2010).

A doença foi inicialmente descrita na Índia como "Phaeosphaeria Leaf Spot" (PLS), e sua etiologia foi atribuída ao fungo *Phaeosphaeria maydis* (RANE et al., 1966). Posteriormente, a doença foi descrita nos Estados Unidos (CARSON et al., 1991; CARSON, 2005). No Brasil, a partir dessas datas, passou a existir um consenso geral entre os fitopatologistas e melhoristas de que o fungo *P. maydis* seria o agente causal da mancha-branca-do-milho, e seu diagnóstico passou a ser relatado considerando-se apenas o aspecto visual

das lesões em plantas cultivadas no campo (FANTIN, 1994; PEGORARO et al., 2001; PINTO, 1999; BRASIL; CARVALHO, 1998; FERNANDES; OLIVEIRA, 1997; FIDELIS et al., 2007). Contudo, evidências experimentais acumuladas ao longo dos anos 1990 e 2000 geraram muitas dúvidas quanto à etiologia da mancha-branca. São elas: 1) a frequência de *P. maydis* (10%) e seu anamorfo *Phyllosticta* sp. (7%) nas lesões da mancha-branca representam valores muito baixos, mesmo para as áreas com elevada severidade da doença; 2) a presença do fungo ainda não foi relatada em várias regiões produtoras de milho onde a doença ocorre com frequência elevada; 3) várias tentativas de realizar o postulado de Koch com o fungo *P. maydis*, em diferentes instituições de pesquisa, consistentemente falharam (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001, 2002; BOMFETI et al., 2008; CERVELATTI et al., 2002; CARLI, 2008; AMARAL et al., 2004; 2005).

Cervelatti et al. (2002) demonstraram que ambas as estruturas reprodutivas, ou seja, sexuada (pseudotécio) e assexuada (picnídio), encontradas frequentemente nas lesões avançadas da mancha-branca, e identificadas como sendo do fungo *P. maydis*, forma imperfeita *Phyllosticta* sp. (RANE et al., 1966; CARSON, 1999; AMARAL et al., 2005), representam duas espécies distintas de fungos e não correspondem aos estados anamórfico e telemórfico do mesmo agente. O fungo isolado dos picnídios foi identificado como *Phoma tropica*, uma espécie saprófita (BOEREMA et al., 2004) que coloniza lesões pré-estabelecidas e não corresponde a *Phyllosticta* sp. (CERVELATTI et al., 2002).

No início da década de 2000, a bactéria *P. ananatis* foi descrita como o agente etiológico da mancha-branca, e a designação

mancha-branca-do-milho (Maize White Spot - MWS) foi proposta para a doença (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001, 2002). Após essa data, vários estudos relataram o papel da bactéria *P. ananatis* na etiologia da doença (POMINI et al., 2007; BOMFETI et al., 2008; PÉREZ-Y-TERRÓN et al., 2009; ALIPPI; LÓPEZ, 2010; KRAWCZYK et al., 2010; LANA et al., 2012).

Recentemente, várias outras espécies de fungos (*Phyllosticta* sp., *Phoma* sp., *P. sorghina*, e *Sporormiella* sp.) isolados de lesões avançadas foram descritos como agentes etiológicos da mancha-branca no Brasil (AMARAL et al., 2004, 2005; AMARAL, 2005; CARLI, 2008). Contudo, falharam todas as tentativas desses autores de realizarem os postulados de Koch, tanto para *P. maydis* como para os outros fungos isolados de lesões em estágio avançado de mancha-branca (AMARAL, 2005). Além disso, as inoculações desses fungos em plantas de milho produzem sintomas muito diferentes daqueles característicos da mancha-branca (SAWAZAKI et al., 1997; PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001, 2002; CERVELATTI et al., 2002; AMARAL et al., 2004, 2005; AMARAL, 2005; FIDELIS et al., 2007). Na atualidade, a etiologia dessa doença ainda constitui um tópico de discussão e debate.

Os sintomas da mancha-branca caracterizam-se inicialmente pelo aparecimento de lesões chamadas “anasarcas” de formato circular, aquosas e verde-claras. Posteriormente, formam-se lesões necróticas, de cor palha, circulares a elípticas, com diâmetro variando de 0,3 a 1,0 cm. Geralmente, as lesões são dispersas no limbo foliar, mas iniciam-se na ponta da folha, progredindo para a base, podendo coalescer. Em geral, os sintomas aparecem inicialmente nas folhas inferiores, dispersando-se rapidamente para as folhas superiores, sendo

mais severos após o pendoamento. Normalmente não são observados sintomas em plântulas de milho. Sob condições de ataque severo, os sintomas da doença podem ser observados também na palha da espiga, podendo provocar seca prematura das folhas e redução no ciclo da planta e no tamanho e peso dos grãos (OLIVEIRA et al., 2004). As lesões podem variar de tamanho, de acordo com o nível de resistência dos genótipos de milho (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2002).

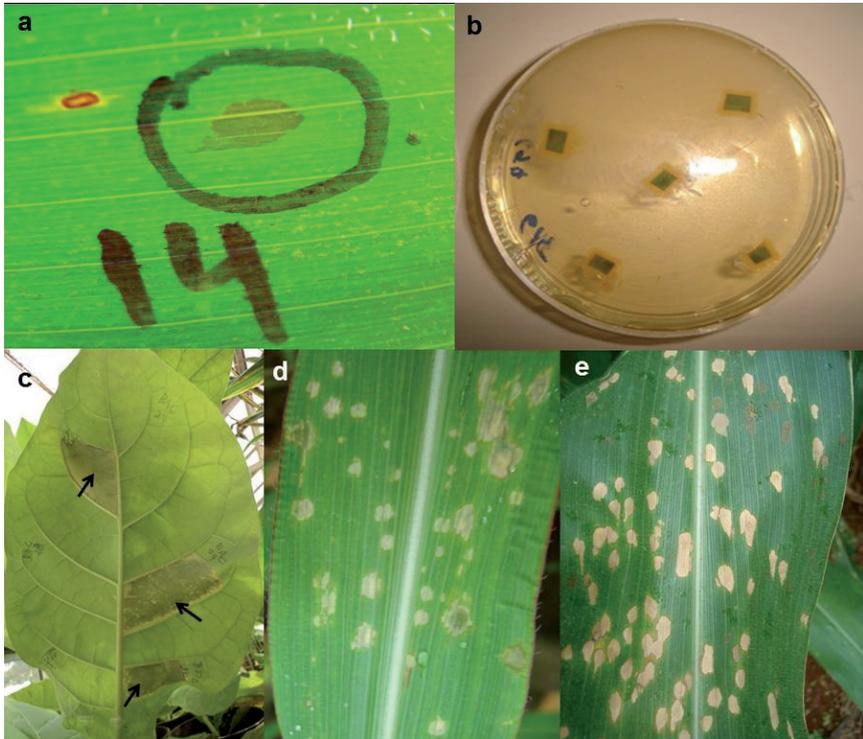
Dentre as estratégias de manejo da mancha-branca, o uso da resistência genética é considerado uma alternativa mais viável, eficiente, segura e de menor impacto ambiental (SAWAZAKI et al., 1997; PEREIRA et al., 2005, FIDELIS et al., 2007). Contudo, as controvérsias sobre a etiologia da doença e a falta de estudos sobre o modo de dispersão do agente causal têm prejudicado a escolha de medidas corretas de manejo da mancha-branca. Portanto, faz-se necessário realizar estudos visando elucidar a etiologia dessa importante doença do milho. O presente trabalho objetivou estudar a etiologia da mancha-branca por meio de inoculações com o fungo *P. maydis* e a bactéria *P. ananatis*, os dois principais organismos relatados como agente causal dessa doença no Brasil.

## Material e Métodos

### Isolamento e Identificação da Bactéria *P. ananatis*

Este estudo foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil. A bactéria *P. ananatis* e o fungo *P. maydis* usados nesse estudo estão armazenados na coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo.

O isolamento bacteriano foi feito a partir de folhas de plantas que apresentavam sintomas iniciais típicos de mancha-branca de milho. As amostras de lesões no estágio inicial, lesões encharcadas ou anasarcas (Figura 1a), foram coletadas no campo e desinfestadas superficialmente segundo o protocolo descrito por Paccola-Meirelles et al. (2001). Fragmentos de lesões individuais de mancha-branca e de folhas assintomáticas foram colocadas em meio de cultivo semissólido TSA (Tryptic (Trypticase) Soy Agar) sem a adição de antibióticos e incubadas à temperatura de 30°C por, aproximadamente, dois dias. O uso de meio de cultivo sem antibiótico possibilitou o crescimento de elevado número de colônias bacterianas de coloração amarela, (Figura 1A e 1B). Seis isolados que produziram colônias de coloração amarela, uma característica morfológica associada com a bactéria *Pantoea ananatis*, foram depositados no Banco de Microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo e receberam os seguintes identificadores: CNPMSPA06, CNPMSPA09, CNPMSPA10, CNPMSPA27, CNPMSPA28 e CNPMSPA29.



**Figura 1.** Sintoma inicial da mancha-branca com aspecto de anasarca em condição de campo (a); colônias de bactéria com pigmentação amarelada, isoladas das anasarcas e cultivadas em meio de cultivo TSA (b); reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco infiltradas com a bactéria *P. ananatis* (reações positivas estão indicadas pela flecha) (c); sintomas semelhantes aos da mancha-branca, em folhas do híbrido DAS657, inoculadas com *P. ananatis* (d), sintomas da mancha-branca em folha naturalmente infectada no campo (e).

## Identificação Molecular dos Isolados de *Pantoea ananatis*

Os seis isolados com características morfológicas de *P. ananatis* foram previamente identificados por meio do sequenciamento

do gene ribossomal 16S (LANA et al., 2012). No presente estudo, o par de iniciadores espécie-específico para *P. ananatis* (ANAF: 5'-CGTGAAACTACCCGTGTCTGTTGC-3' e ANAR: 5'-TGCCAGGGCATCCACCGTGTACGCT-3') (FIGUEIREDO; PACCOLA-MEIRELLES, 2012) foi usado para confirmar a identidade dos isolados bacterianos. As reações de PCR foram realizadas com 25 ng de DNA genômico mais 2.5 µl de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM, gelatina 0,001%), iniciadores na concentração de 2.0 µM cada, dNTP 0,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, e 1 U Taq DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) em um volume total de 25 µl e incubadas no termociclador PTC-100 *thermolcyler machine* (MJ Research, MS, USA) com as seguintes condições: um ciclo para desnaturação do DNA a 94 °C por 1 min, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 68 °C (anelamento) e 1 min a 72 °C (extensão). Finalmente, as reações foram incubadas durante 10 min a 72°C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese horizontal a 6 V/cm<sup>2</sup> em gel de agarose a 1,0% (wt/v) em tampão TAE 1X (Tris-Acetate 0,04 M, EDTA 0,001 M, pH 8,0), adicionado de brometo de etídio (0.5 mg/l). Após a corrida, os géis foram visualizados com luz ultravioleta e fotografados, e os padrões obtidos foram comparados visualmente.

## Reação de Hipersensibilidade em Tabaco

Os seis isolados de *P. ananatis*, que tiveram a identidade confirmada molecularmente, foram inoculados em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, cv. Petit Havana SR1) com o auxílio de uma seringa hipodérmica para avaliar a indução de reação de hipersensibilidade (HR) usando o protocolo descrito por Lana et al. (2012). Cada inoculação foi repetida três vezes para confirmação da reação HR.

## Preparo do Inóculo Bacteriano

A produção do inóculo bacteriano foi realizada com o isolado CNPMSPA09I, cuja reação em tabaco foi positiva, cultivado em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) durante 12 h à temperatura de 30 °C sob agitação de 90 rpm em incubadora do tipo Digital/orbital, modelo OS22 (SC Científica). Em seguida, 1 ml da cultura foi transferido para frasco contendo 100 ml de TSB e incubado por 4 h, em temperatura de 30 °C e agitação de 90 rpm. Uma solução salina de 0.85% NaCl 1M foi adicionada ao inóculo, e a concentração foi ajustada para  $10^6$ – $10^8$  UFC/ml usando um espectrofotômetro. Plantas do híbrido suscetível DAS657 cultivado em casa de vegetação durante 25 dias foram usadas no procedimento de inoculação adaptado de Paccola-Meirelles et al. (2001). Antes da inoculação, as plantas, cujas folhas foram esfregadas com esponja para provocar pequenos ferimentos, foram colocadas em câmara úmida por período de 12 h. Em seguida, a suspensão bacteriana foi aplicada nas superfícies adaxial e abaxial das folhas com o auxílio de um pulverizador (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). As plantas inoculadas foram mantidas na câmara úmida por aproximadamente 12 h e transferidas posteriormente para a casa de vegetação com temperatura de 30°C e 70% de umidade relativa. As plantas usadas como controle foram aspergidas apenas com o meio de cultivo TSB. Três dias após o aparecimento dos sintomas de mancha-branca, amostras de lesões foram coletadas para reisolamento da bactéria *P. ananatis* que foi designada por CNPMSPA09R.

## Isolamento do Fungo *P. maydis* e Inoculação de Plantas

Plantas do híbrido comercial DAS657, suscetível à mancha-branca, crescendo no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo foram utilizadas para o isolamento do fungo *P. maydis*. Lesões avançadas apresentando sintomas característicos da mancha-branca foram coletadas, levadas para o laboratório, lavadas com sabão neutro, secas em temperatura ambiente e armazenadas em câmara úmida. Após 24 h, com auxílio de uma lupa, estruturas fúngicas similares a peritécio foram visualizadas no tecido rompido. Essas estruturas foram coletadas, transferidas para placas de Petri contendo agar, 0,012 mg/ml de antibiótico sulfato de estreptomicina e 20% de extrato de folhas frescas de milho com pH ajustado para 6,5 e incubadas a 20 °C com fotoperíodo de 12 h. Após 10 dias, estruturas fúngicas foram coletadas, observadas ao microscópio e fotografadas. A chave dicotômica para identificação de ascomicetos proposta por Hanlin (1998) foi usada para a identificação dos isolados.

Dois procedimentos diferentes foram usados para testar a patogenicidade do fungo. No primeiro procedimento, 10 ml de água deionizada foram adicionados a cada placa de cultura e os pseudotécios foram raspados do meio usando uma lamínula, e a suspensão foi filtrada em gaze. Após ajustes na concentração, aproximadamente  $10^4$  pseudotécios/ml, a suspensão foi pulverizada sobre as plantas de milho crescidas em casa de vegetação, 25 dias após o plantio. No segundo procedimento, adaptado de Carson (1999), discos miceliais com aproximadamente 1 cm de diâmetro de cultura de *P. maydis* em TSA foram retirados das placas e adicionados no cartucho de plantas de milho no estágio de 8 a 10 folhas. As condições

experimentais usadas para inoculação de *P. maydis* foram as mesmas usadas para inoculação da bactéria *P. ananatis*.

## Resultados e Discussão

### Identificação Molecular da Bactéria *Pantoea ananatis* e Reação HR

Conforme mostrado na Figura 1, bactérias de coloração amarela, uma das características morfológicas de *P. ananatis*, podem ser facilmente isoladas de lesões jovens da doença mancha-branca-do-milho. Seis isolados bacterianos, cujas identidades foram confirmadas por meio da utilização de iniciadores espécie-específicos para *P. ananatis* (FIGUEIREDO; PACCOLA-MEIRELLES, 2012), foram utilizados nos testes de hipersensibilidade.

Três dos seis isolados de *P. ananatis* testados para reação de hipersensibilidade em tabaco foram positivos, confirmando a patogenicidade da bactéria (Figura 1c). Um dos isolados RH positivo CNPMSPA09I foi utilizado para a inoculação de plantas de milho em casa de vegetação.

### Postulado de Koch Utilizando a Bactéria *P. ananatis*

A reprodução dos sintomas da mancha-branca em plantas de milho cultivadas em casa de vegetação foi observada 12 h após a inoculação com *P. ananatis* previamente isolada de lesões da mancha-branca cultivadas no campo. A progressão dos sintomas da mancha-branca em plantas inoculadas na estufa (Figura 1d) foi muito semelhante aos sintomas observados em campo (figura 1e). As plantas utilizadas como controle não

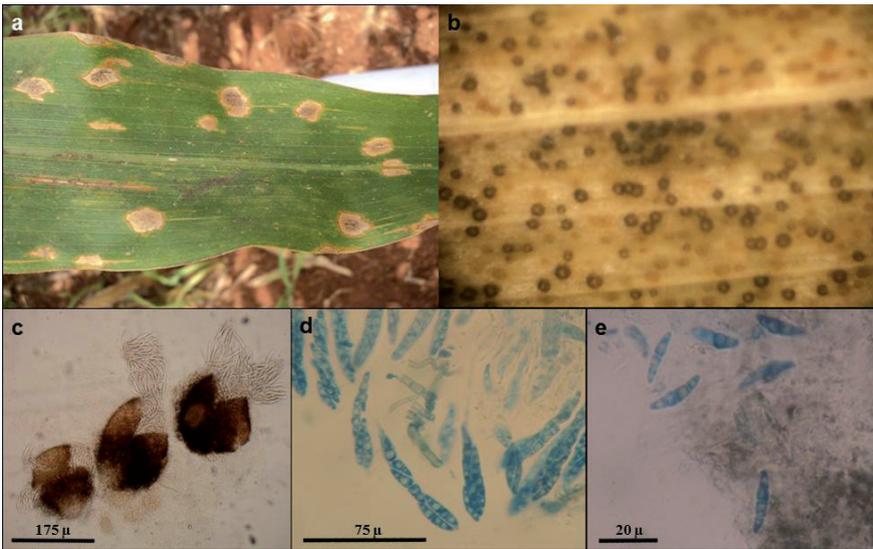
desenvolveram sintomas. Depois de alguns dias, as lesões “anasarcas” (fase 1) progrediram para lesões necróticas de coloração na tonalidade palha (etapa 4). A bactéria de cor amarela foi re-isolada a partir das lesões, e os métodos moleculares confirmaram a sua identidade como sendo *P. ananatis*. Os resultados observados são consistentes com os relatos da literatura sobre a etiologia da mancha-branca (PACCOLA-MEIRELLES et al, 2001, 2002; POMINI et al., 2007; BOMFETI et al., 2008; ALIPPI; LÓPEZ, 2010; PÉREZ-Y-TERRÓN et al., 2009; KRAWCZYK et al., 2010; LANA et al., 2012).

### **Postulado de Koch Utilizando o Fungo *P. maydis***

Estruturas reprodutivas coletadas de plantas infectadas no campo (Figura 2a) e incubadas durante 24 horas em câmara úmida apresentaram estruturas semelhantes a pseudotécios (Figura 2b). Sob o microscópio, ascas bitunicadas contendo em média, oito ascósporos fusiformes, hialinos ou marrons com três septos transversais, sendo uma das células maior do que as outras foram observadas nos pseudotécios (Figura 2c-2e). Estas características morfológicas também foram identificadas em *P. maydis*, por Rane et al. (1966) e Carson et al. (1991). De acordo com a chave dicotômica para identificação de ascomicetos proposta por Hanlin (1998), o fungo isolado a partir de lesões da mancha-branca em folhas de milho corresponde à espécie *Phaeosphaeria maydis*.

Atualmente, existe apenas um relato na literatura especializada descrevendo o sucesso no cumprimento dos postulados de Koch para *P. maydis* (RANE et al., 1966). No presente estudo, várias tentativas de reproduzir os sintomas da mancha-branca empregando os dois diferentes métodos de inoculação em

plantas de milho, em casa de vegetação, consistentemente falharam. Esforços infrutíferos para realizar os postulados de Koch para mancha-branca com *P. maydis*, utilizando diferentes métodos de inoculação, também foram relatados por vários autores (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; CERVELATTI et al., 2002; BOMFETI et al., 2008).



**Figura 2.** Estádio final de desenvolvimento de lesões da mancha-branca, apresentando estruturas reprodutivas de *P. maydis* no centro das lesões. (a); visualização, com microscópio estereoscópico, de pseudotécios no centro das lesões (b); pseudotécios com protusão de ascos visualizados ao microscópio (c); ascos bitunicados com os ascósporos (d); visualização dos ascósporos de *P. maydis* apresentando três septos e expansão da segunda célula (e).

Deve ser ressaltado que as outras espécies de fungos isolados de lesões da mancha-branca, tais como: *Phyllosticta* sp, *Phoma sorghina*, *Sporormiella* Sp. (AMARAL et al. 2004, 2005; CARLI, 2008) não foram testados no presente estudo, pois os sintomas da doença apresentados pelos autores como sintomas *PLS-like* (AMARAL et al., 2005) são muito diferentes dos sintomas MWS/MP. Além disso, considerando-se o fato de que cada um desses fungos estão restritos a determinada região (AMARAL et al., 2004, 2005; AMARAL, 2005; CARLI, 2008), fica claro que eles não podem ser considerados como agentes etiológicos da mesma doença.

Outros aspectos que devem ser considerados estão relacionados com as formas *Phyllosticta* sp. e *Sporormiella* sp. Cervelatti et al. (2002) e demonstraram que as estruturas de reprodução sexuada e assexuada (pseudotécios e picnídios) encontradas em lesões avançadas de mancha-branca, identificadas como sendo o fungo *P. maydis* (forma imperfeita *Phyllosticta* sp.), pertencem a diferentes espécies de fungos, e não às formas teleomórficas e anamórficas do mesmo agente. A correta identificação de *Phyllosticta* sp. é *Phoma tropica* (CERVELATTI et al., 2002), uma espécie de fungo saprófita (BOEREMA et al., 2004).

Em relação ao fungo *Sporormiella* sp., as espécies deste gênero são coprófilos obrigatórios e dependentes do sistema digestivo dos herbívoros para sobreviver (AHMED; CAIM, 1972; GONZÁLES; HANLIN, 2008). Portanto, a presença de *Sporormiella* sp. em lesões da mancha-branca deve ser o resultado de artefato de inoculação, conforme foi salientado por Amaral (2005).

## Conclusões

Sintomas semelhantes aos da mancha-branca foram reproduzidos quando folhas de plantas de milho, cultivadas em casa de vegetação, foram inoculadas com a bactéria *P. ananatis*.

Os testes de HR em plantas de tabaco comprovaram a patogenicidade de três isolados de *P. ananatis* utilizados neste estudo.

Não foi observado qualquer sintoma nas folhas das plantas de milho, cultivadas em casa de vegetação, quando inoculadas com o fungo *P. maydis*, com as duas metodologias de inoculação utilizadas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Viçosa, à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) pela Bolsa de Estudos fornecida ao estudante Fabrício E. Lanza. Esse trabalho foi realizado com recursos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Milho e Sorgo).

## Referências

AHMED, S. E.; CAIN R. F. Revision of the genera *Sporormia* and *Sporormiella*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, p. 419-477, 1972.

ALIPPI, A. M.; LÓPEZ, A. C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. **Plant Disease**, St. 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**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMARAL, A. L. **Etiologia e genética da resistência à mancha branca do milho**. 2005. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

AMARAL, A. L.; SOGLIO, F. K.; CARLI, M. L.; NETO, J. F. B. Pathogenic fungi causing symptoms similar to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 44-49, 2005.

AMARAL, A. L.; CARLI, M. L.; NETO, J. F. B.; 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.

BOEREMA, G. H.; GRUYTER, J.; NOORDELOOS, M. E.; HAMERS, M. E. C. **Phoma identification manual**: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. Cambridge: CABI Publishing, 2004.

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.

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.

CAPUCHO, A. S.; ZAMBOLIM, L.; DUARTE, H. S. S.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P. A.; LANZA, F. E.; COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Influence of leaf position that corresponds to whole plant severity and diagrammatic scale for white spot of corn. **Crop Protection**, Surrey, v. 29, p. 1015-1020, 2010.

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. 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.

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.

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

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

FIDELIS, R. R.; MIRANDA, G. V.; AFFÉRRI, F. S.; PELUZIO, J. M. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis* sob estresse de fósforo, no estado do Tocantins. **Ciência Desenvolvimento**, v. 2, p. 177-186, 2007.

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 Plant Pathology**, v. 94, p. 663-667, 2012.

GONZÁLES, M. C.; HANLIN, R. T. Distribution and occurrence of Ascomycetes in Mexico. **North American Fungi**, v. 3, p. 139-145, 2008.

HANLIN, R. T. **Illustrated genera of ascomycetes combined keys**. St. Paul: APS Press, 1998.

KRAWCZYK, K.; KAMASA, J.; ZWOLINSKA, A.; POSPIESZNY, H. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. **Journal Plant Pathology**, 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**, Berlin, v. 160, p. 441-448, 2012.

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.

OLIVEIRA, E.; FERNANDES, F. T.; CASELA, C. R.; PINTO, N. F. J. A.; FERREIRA, A. S. Diagnose e controle de doenças na cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 226-267.

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.

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.

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

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**, v. 4, p. 96-99, 2009.

PINTO, N. F. J. A. Eficiência de doses e intervalos de aplicação de fungicidas no controle da mancha foliar do milho provocada por *Phaeosphaeria maydis* Rane, Payak & Renfro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, p. 1006-1009, 1999.

POMINI, A. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MARSAIOLI, A. J. Acyl-Homoserine lactones produced by *Pantoea* sp. isolated from the "Maize White Spot" foliar disease. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 1200-1204, 2007.

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.

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.



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

