

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

**Estratégias genético-moleculares visando à detecção do patógeno e
à identificação de análogos de genes de resistência associados com
a mancha branca do milho**

DOUTORANDO: Ubiraci Gomes de Paula Lana

ORIENTADORA: Dra. Cláudia Teixeira Guimarães

CO-ORIENTADOR: Dr. Jurandir Vieira de Magalhães

BELO HORIZONTE

Dezembro/2012

UBIRACI GOMES DE PAULA LANA

Estratégias genético-moleculares visando à detecção do patógeno e à identificação de análogos de genes de resistência associados com a mancha branca do milho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Dra. Cláudia Teixeira Guimarães

Co-orientador: Dr. Jurandir Vieira de Magalhães

BELO HORIZONTE

Dezembro/2012

Dedico esta tese aos meus pais Vicente e Ieda,
À Mary e Júlia,
pelo amor, confiança e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e à Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de formação profissional.

À Embrapa Milho e Sorgo por proporcionar o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Dra. Cláudia Teixeira Guimarães pela confiança e sugestões.

Ao meu co-orientador Dr. Jurandir Vieira de Magalhães pelo apoio e ensinamentos.

Aos Pesquisadores do Núcleo de Biologia Aplicada, em especial à Dra. Isabel Souza, pelo apoio e incentivo.

Às professoras Dra. Eveline Caixeta e Dra. Maria Bernadete Lovato pelas sugestões, pela gentileza e disponibilidade em compor a minha banca de defesa de tese.

Ao Dr. Roberto Noda pelo auxílio nas análises de Bioinformática.

À equipe da fitopatologia, Luciano, Rodrigo, Dagma, Clóvis e Fabrício, por toda a ajuda.

Aos colegas da Embrapa, especialmente ao Célio e Osni, pelo importante auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Rosângela pelas correções bibliográficas.

À Malu e Edna pelo apoio e incentivo.

Aos amigos da Pós-Graduação, Janaína, Bárbara e Gabriel, pelas contribuições e incentivo.

Aos demais amigos pelos momentos compartilhados, em especial ao Fernando, Lili e Christiane por tornar os dias mais agradáveis.

Aos meus irmãos, tios, primos e avós pela torcida.

Aos meus pais Vicente e Ieda pelo constante apoio.

À Mary por todo amor, paciência, compreensão e por compartilhar comigo a sua vida.

À Júlia, meu bem mais precioso, pelo amor incondicional.

A todos que estiveram presentes e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Acima de tudo, agradeço a Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	13
ABSTRACT	14
DELINEAMENTO DA TESE	15
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 A mancha branca do milho	16
1.2 Agente etiológico e medidas de controle da doença	17
1.3 Resistência do milho à mancha branca	18
1.4 Mecanismos de resistência em plantas	19
1.5 Análogos de genes de resistência (RGAs)	22
1.5 Referências bibliográficas	24
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. CAPÍTULO 1	35
Detection and molecular diversity of <i>Pantoea ananatis</i> associated with white spot disease in maize, sorghum and crabgrass in Brazil	36
Abstract	36
Introduction	36
Material and methods	37
Bacterial isolates and culture conditions	37
DNA extraction	37
PCR assay to detect <i>Pantoea ananatis</i>	37
DNA sequencing	37
Hypersensitive response (HR) on tobacco	38
rep-PCR	38
Results	38
Phenotypic selection of <i>Pantoea ananatis</i>	38
Molecular detection of <i>Pantoea ananatis</i> from symptomatic leaves of maize, sorghum and crabgrass	38
Hypersensitive response on tobacco leaves	39
Assessing the genetic diversity of <i>Pantoea</i> species by rep-PCR	39

Discussion	39
A specific PCR assay to identify <i>Pantoea ananatis</i> in grasses	39
<i>Pantoea ananatis</i> in white spot lesions from maize, sorghum and crabgrass	41
Genetic diversity of <i>Pantoea</i> species	41
Acknowledgements	42
References	42
4. CAPÍTULO 2	44
Resistance gene analogs colocalized with white spot disease resistance QTL in maize	45
Abstract	45
1. Introduction	46
2. Material and methods	47
2.1 Genetic material	47
2.2 Experimental desing and plant phenotyping	47
2.3 QTL mapping	47
2.4 Searching for maize RGAs	48
2.5 Development of RGA-tagged markers	49
2.6 RGA Expression Analysis	49
3. Results	50
3.1 Statistical analysis of phenotypic data	50
3.2 QTL mapping	50
3.3 Abundance and distribution of RGAs in the maize genome	54
3.4 RGAs domains	54
3.5 Localization and characterization of RGAs associated with MWS resistance QTL	56
3.6 Expression pattern of four RGA candidates for MWS resistance	56
4. Discussion	57
4.1 MWS resistance QTL	57
4.2 RGAs in maize genome	58
4.3 Candidate RGAs for MWS resistance	59
5. Acknowledgements	60
6. References	60
7. Supporting information	66
5. CONCLUSÃO GERAL	104

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1. Grasses with similar symptoms of the maize white spot disease and bacterial colonies isolated from the leaf lesions. (a) Maize and crabgrass. (b) Crabgrass. (c) Sorghum. (d) Bacterial isolates from white spot lesions of maize (1-26 and 28), crabgrass (27) and sorghum (29) on TSA medium 39

Figure 2. Multiplex PCR reaction profiles showing the amplification products of *ina* (ice nucleation) gene fragment at 343 bp and 16S rDNA internal control (524 bp) for the bacterial isolates from white leaf spot lesions of maize (1-26 and 28), crabgrass (27) and sorghum (29). (a) Amplification pattern using bacterial cell culture and (b) extracted DNA. Arrowheads indicate the target fragments and MM is the 1 kb DNA ladder 39

Figure 3. Reaction of tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) 48 h after infiltration with YB medium (0) and some bacterial isolates (07, 08, 09, 10) 40

Figure 4. Dendrogram showing the *Pantoea* isolates from leaf lesions on maize, sorghum and crabgrass after cluster analysis of rep-PCR primers using the UPGMA method 41

CAPÍTULO 2

Figure 1. A compilation of MWS resistance QTL mapped in maize over the three different studies, where the bars represent the MWS resistance QTL identified by Carson et al. (2005) [■] Moreira et al. (2009) [▨] and by this study [▩]. Molecular markers are shown at right side of the chromosomes and distance in centimorgans at left. The markers followed by asterisks are the RGA-tagged markers 52

Figure 2. Distribution of the RGAs in the maize genome. Numbers in the right indicate the maize chromosomes. In x-axis, each number represents an interval in Mbp x 10 and the Y-axis represents the number of RGAs. The dotted lines show the estimated positions of the MWS resistance QTL identified in the present study 55

Figure 3. Relative expression of four RGAs in resistant and susceptible maize lines for MWS disease under natural infection in the field. Susceptible (S) L726 and resistant line (R) L31.2.1.2 evaluated after 30 and 60 days (D) of seed germination. The bars represent the standard error of three technical replicates of five plants. The sample S_30D was used as calibrator in each assay 57

Figure S1. Frequency distribution of mean MWS disease score of 99 $F_{2:3}$ families derived from the cross of maize inbred lines L31.2.1.2 (resistance) and L726 (susceptible). Families score are means of ten plants evaluated in triplicate in each of two environments (Sete Lagoas and Uberlândia) in Brazil 103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Species identification based on 16S rDNA sequence identity of bacterial isolates from white leaf spot lesions in maize, sorghum and crabgrass	40
---	----

CAPÍTULO 2

Table 1. MWS resistance QTL including the genomic positions in cM, effects, gene action, interactions, and coefficients of determination (R^2)	53
---	----

Table 2. Number of RGAs co-localized with MWS resistance QTL in the maize genome	56
---	----

Table S1. Primers sequence for reference and target genes used in expression analyses	66
--	----

Table S2. Values and significances of the mean squares from the joint analysis of variance for reaction of maize $F_{2:3}$ progenies to MWS disease	67
--	----

Table S3. RGAs in maize genome	68
---	----

Table S4. Molecular markers based on RGA sequences incorporated in genetic map	102
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Ação gênica aditiva
Avr	<i>Avirulence gene</i> - gene de avirulência
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>Base pairs</i> – pares de bases
Ca ²⁺	Cátion cálcio
CAPS	<i>Cleaved amplified polymorphic sequence</i> – polimorfismo de sequência amplificada e clivada
cDNA	<i>Complementary DNA</i> – DNA complementar
CFU	<i>Colony-forming units</i> – unidade formadora de colônia
Cl ⁻	Ânion cloreto
cM	Centimorgans
C _T	<i>Threshold cycle</i>
CTAB	<i>Cetyl trimethyl ammonium bromide</i> - brometo de cetil trimetil amônio
D	Ação gênica de dominância
d	Efeito da dominância
d/a	Grau de dominância
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> - dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>Desoxynucleotide triphosphate</i> – trifosfato de desoxinucleotídeos
eLRR	<i>Extracellular leucine-rich repeat</i> – repetição rica em leucina extracelular
EST	<i>Expressed sequence tag</i> – etiqueta de sequência expressa
F	<i>Forward primer</i> – Primer direto
F ₁	Primeira geração de híbridos
F ₂	Autofecundação de plantas F ₁
F _{2:3}	Plantas originadas de semente F ₂
Gene R	Gene de resistência
h	Horas
H ⁺	Cátion hidrogênio
HR	<i>Hypersensitive response</i> – resposta de hipersensibilidade
Indel	Inserção/Deleção

K ⁺	Cátion potássio
kpb	Kilo pares de base
L	Litro
LOD	<i>Logarithm of the odds</i> - logaritmo da probabilidade
LR	<i>Likelihood ratio</i> - razão de verossimilhança
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i> – repetição rica em leucina
M	Concentração em mol/L
mL	Mililitro
m/v	Massa/volume
Mg ²⁺	Cátion magnésio
Mbp	<i>Mega base pairs</i> – mega pares de bases
MIM	<i>Multiple interval mapping</i> - mapeamento por interval múltiplo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MWS	<i>Maize white spot</i> – mancha branca do milho
NBS	<i>Nucleotid binding site</i> – sítio de ligação de nucleotídeos
ng	Nanograma
OD	<i>Over dominance</i> - Ação gênica de sobredominância
P	Fósforo
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
PD	<i>Partial dominance</i> - ação gênica de dominância parcial
Pfam	Banco de dados de famílias de proteínas
PK	<i>Protein kinase</i> – protein quinase
PRG database	<i>Plant resistance gene database</i> – banco de dados de genes de resistência em plantas
Proteínas R	Proteínas de resistência
QTL	<i>Quantitative trait locus</i> – locos de características quantitativas
R	<i>Reverse primer</i> – Primer reverso
Rep-PCR	PCR baseada na amplificação de sequências repetitivas de bactérias
RGA	<i>Resistance gene analogs</i> – análogos de genes de resistência
R-genes	<i>Resistance genes</i> – genes de resistência
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico
RQ	<i>Relative quantification</i> – quantificação relativa
RT	<i>Reverse transcription</i> – transcrição reversa

SAM	Seleção assistida por marcadores
sec	Segundo
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – polimorfismo de base única
SSR	<i>Single Sequence Repeat</i> – sequências simples repetidas
STK	<i>Serine treonine Kinase</i> – quinase serina treonina
SYBR	Fluoróforo para PCR em tempo real que se liga ao DNA dupla fita.
Taq DNA polimerase	DNA polymerase derivada de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão tris-EDTA
TIR	<i>Interleukin-1 receptor</i> – receptor interleucina-1
TM	<i>Transmembrane</i> - transmembrana
TSA	<i>Trypticase soy agar</i> - agar triptona de soja
TSB	<i>Trypic soy broth</i> – Caldo triptona de soja
U	Unidade enzimática
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPGMA	<i>Unweighted pair group with arithmetic mean</i> - agrupamento com média aritmética não ponderada
w/v	<i>Weight /volume</i> - massa/volume
YP	<i>Yeast peptone</i> – peptona levedura
x g	Unidade de centrifugação, x gravidade
ΔC_T	C_T do gene alvo subtraído do gene de referência
$\Delta\Delta C_T$	Método C_T comparativo: ΔC_T do gene alvo subtraído do ΔC_T do calibrador
16S rDNA	Subunidade 16S do DNA ribossômico
°C	Grau Celsius
pmols	Picomols
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µM	Micromolar

RESUMO

O milho é um dos cereais de maior importância econômica no mundo, sendo amplamente utilizado na alimentação humana e animal e, recentemente, na produção de biocombustível. Apesar do Brasil ocupar a terceira posição no cenário mundial de produção de milho, essa cultura está sujeita à ocorrência de várias doenças, como a mancha branca que tem causado perdas significativas na produção e na qualidade dos grãos. Apesar da importância dessa doença, existe uma carência de informações sobre o patógeno, que tem sido reportado como a bactéria *Pantoea ananatis*, e sobre regiões genômicas associadas com a resistência à mancha branca em milho. Assim, os principais objetivos do presente trabalho foram: (i) desenvolver um teste diagnóstico para identificação do patógeno; (ii) avaliar a diversidade genética da bactéria *P. ananatis*; (iii) mapear QTLs de resistência à mancha branca em milho tropical e (iv) identificar análogos de genes de resistência (RGAs) co-localizados com QTLs de resistência à doença. Uma metodologia rápida, de baixo custo e seletiva baseada em PCR foi implementada para detecção de *P. ananatis*. Foi verificada uma elevada variabilidade genética entre 18 isolados do gênero *Pantoea* presentes nas folhas de milho, sorgo e capim-colchão com sintomas da doença que deve ser considerada em programas de melhoramento genético de milho visando à geração de cultivares resistentes. Entretanto, isolados de *P. ananatis* de milho, sorgo e capim-colchão foram reunidos em um mesmo grupo, reforçando a existência de possíveis hospedeiros alternativos do patógeno. Adicionalmente, foram mapeados em milho oito QTLs nos cromossomos 1, 2, 3, 4 e 8, explicando, aproximadamente, 90% da variância genotípica da resistência à mancha branca em dois ambientes, Sete Lagoas e Uberlândia. Uma busca por meio de ferramentas de bioinformática utilizando 93 genes de resistência de plantas permitiu a identificação de 939 RGAs no genoma do milho, dos quais 123 foram co-localizados *in silico* com os QTLs de resistência à mancha branca. Dentre estes, os genes candidatos *Pto20*, *Pto99* e *Xa26.151.4* foram geneticamente co-localizados com QTLs nos cromossomos 4 e 8, apresentando um padrão de super-expressão na linhagem resistente. Assim, os resultados gerados neste trabalho terão uma contribuição fundamental para o delineamento de estratégias de controle epidemiológico e genético da mancha branca em milho.

Palavras-chave: *Zea mays* L., doença mancha branca, *Pantoea ananatis*, detecção molecular, diversidade genética, mapeamento de QTLs, análogos de genes de resistência.

ABSTRACT

Maize is one of the most economically important cereals in the world, extensively used for food and feed, and recently, for biofuel production. Although Brazil occupies the third position on world maize production, this crop is subject to various diseases, such as white spot that has caused significant losses in production and grain quality. Despite the importance of this disease, there is a lack of information about the pathogen, which has been reported as the bacterium *Pantoea ananatis*, and genomic regions associated with maize white spot resistance. Thus, the main objectives of this study were: (i) to develop a diagnostic test for pathogen identification, (ii) to evaluate the genetic diversity of *P. ananatis* isolates, (iii) to map resistance QTL associated with white spot disease in tropical maize and (iv) to identify resistance gene analogs (RGAs) colocalized with maize white spot resistance QTL. A rapid, inexpensive and selective diagnostic test PCR-based was implemented to detect *P. ananatis*. It was verified a high genetic variability among 18 isolates of the genus *Pantoea* from maize, sorghum, and crabgrass leaves with symptoms of the disease that should be considered in breeding programs aiming at generating resistant maize cultivars. Besides, *P. ananatis* from maize, sorghum and crabgrass were clustered in a single group, reinforcing the existence of possible alternative hosts of the pathogen. Additionally, eight QTL were mapped on chromosomes 1, 2, 3, 4 and 8, accounting for approximately 90% of the genetic variance of maize white spot resistance in two environments, Sete Lagoas and Uberlândia. Data mining with 93 plant resistance genes allowed the identification of 939 RGAs in the maize genome, of which 123 were colocalized *in silico* with white spot resistance QTL. Among these candidate genes, *Pto20*, *Pto99* and *Xa26.151.4* were genetically colocalized with QTL on chromosomes 4 and 8, showing an over expression pattern in the resistant line. Thus, the results generated in this study will have a fundamental contribution to design epidemiologic and genetic control strategies for maize white spot management.

Keywords: *Zea mays* L., white spot disease, *Pantoea ananatis*, molecular detection, genetic diversity, QTL mapping, resistance gene analogs.

DELINEAMENTO DA TESE

Esta tese é constituída por dois capítulos e está subdividida da seguinte maneira:

- Resumo e abstract.
- Introdução e revisão de literatura, onde é feita uma abordagem objetiva sobre os principais temas propostos nos dois capítulos da tese.
- Objetivos, geral e específicos.
- Capítulo 1 corresponde a um artigo científico publicado na revista Journal of Phytopatology: “Detection and Molecular Diversity of *Pantoea ananatis* Associated with White Spot Disease in Maize, Sorghum and Crabgrass in Brazil”.
- Capítulo 2 é o segundo artigo que será submetido em breve para revistas de impacto em torno de 4, intitulado “Resistance gene analogs colocalized with white spot disease resistance QTL in maize”.
- Conclusão geral.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A mancha branca do milho

O milho é o cereal mais cultivado no mundo, com uma produção de 840 milhões de toneladas na safra 2010/2011 (FAO, 2012). No Brasil, a produção de milho na safra 2010/2011 foi de 57,4 milhões de toneladas cultivadas em 13,8 milhões de hectares (CONAB, 2012). Além disso, a estimativa de produção na safra 2011/2012 será 27% maior que na safra anterior, consolidando o país como o terceiro produtor mundial, depois dos Estados Unidos e da China. Entretanto, a cultura do milho está sujeita à ocorrência de várias doenças que podem afetar a produção, a qualidade e o valor nutritivo dos grãos.

No Brasil, a mancha branca é considerada, atualmente, como uma das principais doenças foliares da cultura do milho, tanto pelos prejuízos que tem causado às cultivares suscetíveis, quanto pela sua ampla distribuição (Costa et al., 2010). Sua ocorrência tem sido relatada em praticamente todas as regiões produtoras de milho do Brasil, além de várias outras regiões tropicais (Moreira, 2004; Pérez-y-Terrón et al., 2009; Alippi e López, 2010; Sibiyi et al., 2011) e subtropicais do mundo (Carson, 2001; Krawczyk et al., 2010). Os sintomas da doença apresentam-se na forma de lesões foliares irregulares a elípticas, inicialmente aquosas verde-claro que vão evoluindo para lesões necróticas. Geralmente são encontradas dispersas no limbo foliar, mas iniciam-se na ponta da folha, progredindo para a base, podendo haver coalescência entre várias lesões. Em geral, os sintomas surgem inicialmente nas folhas inferiores, progredindo rapidamente para a parte superior das plantas (Costa et al., 2010).

A mancha branca começou a gerar grandes perdas de produção quando passou a antecipar seu ciclo de desenvolvimento para as fases de florescimento ou anteriores da cultura do milho, comprometendo a produção de grãos pela diminuição da área fotossintética, com relatos de perdas de até 60% (Fernandes e Oliveira, 1997). Os sintomas são mais evidentes e severos após o pendoamento (Costa et al., 2010). A variável severidade tem sido descrita como a mais apropriada para quantificar doenças foliares como a mancha branca, referindo-se à porcentagem da área ou do volume de tecido da planta cobertos por sintomas (Silva, 2002; Malagi et al., 2011). Uma alta severidade confere à planta um aspecto de queima, podendo causar a seca prematura das folhas e redução do ciclo da planta, em função da suscetibilidade do cultivar e do ambiente favorável.

São consideradas condições ambientais favoráveis para a doença a ocorrência de umidade relativa acima de 60% e temperaturas noturnas em torno de 14°C

(Fernandes et al., 1995). Assim, os plantios tardios de milho realizados a partir de novembro, em geral, permitem que a cultura se desenvolva sob altas precipitações pluviométricas, propiciando as condições adequadas para o desenvolvimento da doença no Brasil (Fernandes e Oliveira, 1997). Além das condições climáticas e do genótipo, o manejo da adubação pode ser responsável pela predisposição das plantas ao ataque de patógenos (Bedendo, 1995). Alguns trabalhos têm demonstrado que a severidade da mancha branca pode ser também afetada pela época de adubação e doses de nitrogênio (Parentoni et al., 1996; Costa, 2001; Fidelis et al., 2003).

1.2 Agente etiológico e medidas de controle da doença

A etiologia dessa doença é ainda controversa junto à comunidade científica e a sua epidemiologia pouco conhecida. Os primeiros relatos sobre a doença no Brasil datam do início dos anos 1980 no oeste do Paraná (Reis e Casa, 1996). Inicialmente, a doença foi denominada mancha de *Phaeosphaeria*, sendo atribuída ao fungo *Phaeosphaeria maydis*, causador de estruturas filamentosas encontradas em lesões em estágio avançado da doença (Fantin, 1994; Carson, 1999).

Posteriormente, Paccola-Meirelles et al. (2001) isolaram uma bactéria Gram-negativa, formadora de colônia amarelada, em lesões em estágio inicial, conhecidas como anasarcas. Esses autores relataram a presença do fungo *P. maydis* apenas nos estágios finais de desenvolvimento da doença e demonstraram que plantas de milho inoculadas com a bactéria apresentavam os mesmos sintomas típicos da doença. Assim, a bactéria identificada como *Pantoea ananatis* foi reportada como agente causal dessa doença, denominada então como mancha branca (Paccola-Meirelles et al., 2001).

Já Amaral et al. (2004) isolaram o fungo *Phoma sorghina* de lesões necróticas da doença. No entanto, posteriormente, o mesmo grupo relatou a existência de diferentes agentes etiológicos da doença, como *Phyllosticta* sp., *Phoma sorghina* e *Sporormiella* sp., dependendo do local do plantio (Amaral et al., 2005). Assim, as condições ambientais poderiam influenciar a predominância de um ou outro agente causal (Amaral et al., 2005; Carli, 2008). Por outro lado, vários trabalhos realizados no Brasil (Bomfeti et al., 2008; Lanza, 2009; Gonçalves, 2012), México (Pérez-y-Terrón et al., 2009), Argentina (Alippi e López, 2010) e Polônia (Krawczyk et al., 2010) reforçaram o papel da bactéria *P. ananatis* como agente causal da mancha branca em milho.

P. ananatis é uma bactéria não formadora de esporos, sendo uma das poucas espécies conhecidas que apresentam genes de nucleação por gelo (*ina*), que permitem a produção de gelo em temperaturas que normalmente não poderiam ser

formados (Abe et al., 1989). A bactéria *P. ananatis* também tem sido relatada como agente causal de doenças em outras espécies vegetais, incluindo arroz (Cother et al., 2004), cebola (Gitaitis e Gay, 1997), eucalipto (Coutinho et al., 2002), melão (Kido et al., 2008) e sorgo (Cota et al., 2010). No entanto, a epidemiologia de doenças em plantas causadas por *P. ananatis* em diferentes hospedeiros é relativamente desconhecida, apesar de relatos da influência de fatores ambientais na severidade da doença (Coutinho e Venter, 2009).

Algumas medidas de controle podem auxiliar na diminuição do inóculo e nos danos causados pelo patógeno, como a eliminação de restos culturais, adubação balanceada, plantios mais precoces e rotação de culturas (Casela et al., 2006). Recentemente, grande ênfase tem sido dada ao uso de fungicidas como estratégia de controle das doenças foliares na cultura do milho, incluindo a mancha branca. No Brasil, existem apenas alguns produtos registrados para controle da mancha branca, principalmente à base de estrobilurinas. Dentre esses, três fungicidas foram avaliados quanto à eficiência para o manejo da mancha branca, sendo dois deles eficientes no controle da doença em condições de campo e na inibição do crescimento *in vitro* da bactéria *P. ananatis* (Costa, 2008). Entretanto, a aplicação de fungicidas pode não resultar em benefício econômico, ou seja, o aumento de produtividade pode ser menor que o custo requerido para a realização da aplicação do produto (Costa et al., 2012). Assim, o desenvolvimento de cultivares resistentes é considerado como a estratégia mais eficiente na redução dos custos de produção e do impacto ambiental (Schuelter et al., 2003).

1.3 Resistência do milho à mancha branca

Embora a mancha branca seja de reconhecida importância, é recente a busca por informações genéticas quanto à resistência a esta doença em milho. Normalmente, a característica apresenta herança quantitativa e apesar da maioria dos trabalhos reportar a ação gênica aditiva como mais importante na herança do caráter (Carson, 2001; Silva, 2002; Schuelter et al., 2003; Silva e Moro, 2004; Guimarães et al., 2009), alguns trabalhos relataram a maior importância da ação gênica de dominância (Das et al., 1989a; 1989b). Apesar da sua herança quantitativa, a resistência à mancha branca tem sido descrita como um caráter de alta herdabilidade (Lopes et al., 2007; Moreira, et al., 2009; Pegoraro et al., 2002).

Apenas três trabalhos com mapeamento de QTLs para a reação à mancha branca foram reportados em milho, sendo um com germoplasma de clima temperado e dois de origem tropical. Carson et al. (2005) mapearam cinco QTLs nos cromossomos 1, 4, 7 e 8. Em condições tropicais, Lopes (2003) reportou o mapeamento de cinco

QTLs, localizados nos cromossomos 1, 2, e 5, além de dois no cromossomo 4. Em outro estudo, Moreira et al. (2009) mapeou seis QTLs, nos cromossomos 1, 3, 4, 6 e dois no cromossomo 8, explicando em conjunto 41,6% da variância fenotípica. Segundo Moreira (2004), o predomínio de poucos QTLs de ação gênica aditiva e a elevada herdabilidade da resistência à mancha branca indicam que a seleção fenotípica pode culminar na obtenção de genótipos com alto nível de resistência à doença. Entretanto, a avaliação da resistência é realizada na fase do florescimento ou enchimento dos grãos, períodos de maior incidência da doença, e depende da inoculação natural em campo. Assim, a seleção fica limitada aos locais onde existe alta incidência da doença.

Com o aperfeiçoamento dos marcadores e das estratégias de mapeamento, houve um acréscimo significativo de informações genéticas e de QTLs associados com a resistência a doenças. O mapeamento de QTLs tem como sua principal aplicação a identificação de regiões genômicas associadas com uma característica de importância, que podem ser utilizadas em programas de melhoramento. No entanto, para que as estratégias de seleção assistida por marcadores (SAM) sejam efetivas no desenvolvimento de cultivares, é necessário que os QTLs sejam validados e que sejam gerados marcadores polimórficos flanqueando os QTLs de resistência.

O uso de marcadores ligados aos locos de resistência reduz a necessidade de fenotipagem, permitindo a identificação precoce de plantas resistentes na ausência do patógeno e a piramidação de genes de resistência a diferentes patógenos, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento (Bouchez et al., 2002).

1.4 Mecanismos de resistência em plantas

Recentemente, diversas pesquisas têm enfatizado a identificação de genes que codificam proteínas de defesa, aumentando o conhecimento sobre os mecanismos desenvolvidos pelas plantas para prevenirem a progressão de doenças. A resistência de um hospedeiro pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos. Embora as plantas estejam normalmente expostas a um número incalculável de patógenos, o processo de resistência mostra-se como regra, enquanto que a suscetibilidade é uma exceção (Pascholati e Leite, 1995). O patógeno falha em se estabelecer em uma planta devido a três possíveis razões. Na primeira delas a planta mostra-se incapaz de suportar os requerimentos fisiológicos de um patógeno potencial e, portanto, não pode ser considerada como hospedeiro. Outra razão deve-se a existência de barreiras estruturais pré-formadas tais como paredes celulares, tricomas e cutículas mais espessas, cera ou compostos tóxicos sintetizados pelas plantas como peptídeos,

proteínas e metabólitos secundários, que restringem a infecção dos patógenos (Freeman e Beattie, 2008). Por último, a planta reconhece o ataque do patógeno quando são ativados mecanismos de defesa que impedem sua proliferação. Tais interações são consideradas incompatíveis, mas somente a última depende da indução da resposta na planta (Hammond-Kosack e Jones, 1996).

Frequentemente, a resposta de defesa induzida por genes de resistência pode ser explicada pela teoria gene-a-gene. O reconhecimento de um patógeno resulta da interação do produto de um gene de resistência (gene R) com o produto do gene de avirulência (Avr) correspondente do patógeno (Flor, 1971). O reconhecimento específico da proteína Avr do patógeno pela planta hospedeira ocorre por meio de receptores proteicos codificados por genes R, resultando em uma rápida resposta de defesa (De Wit, 1995; Taiz e Zeiger, 2004). Entre as diferentes respostas de defesa desencadeadas estão a resposta de hipersensibilidade (HR), a liberação de radicais livres, o reforço da parede celular por lignificação e/ou produção de calose, a síntese de compostos antimicrobianos e a indução de proteínas relacionadas à patogênese (Staskawicz et al., 1995; Knogge, 1996). Entretanto, o principal componente da resposta de defesa ativada pelo produto de genes R consiste na HR, que é uma resposta de defesa local, ativada somente nos pontos de contato entre a planta e o patógeno (Hammond-Kosack e Jones, 1996).

A maioria dos genes R em mono e dicotiledôneas possui domínios filogeneticamente conservados, indicando que o modo de reconhecimento de diferentes patógenos e a sinalização de defesa da planta foram conservados durante sua evolução e diversificação (Hammond-Kosack e Jones, 1997). Entre as principais regiões conservadas encontradas entre as proteínas de resistência (proteínas R) incluem-se domínios C-terminais com repetições ricas no aminoácido leucina (leucine-rich repeats, LRR), domínio central com sítios de ligação a nucleotídeos trifosfatados (nucleotide binding site, NBS) e domínios N-terminais variáveis (Hammond-Kosack e Parker, 2003).

O domínio LRR está presente em muitas proteínas com diferentes funções, envolvido na mediação de interações entre proteínas. O domínio LRR pode estar envolvido no reconhecimento direto ou indireto dos produtos do gene de avirulência do patógeno (Kobe e Kajava, 2001), sendo encontrado, por exemplo, em genes R como *Pi-ta* de arroz (Jia et al., 2000) e *Mi* de tomate (Hwang et al., 2000).

O domínio NBS, também conhecido como NB-ARC, está presente em várias famílias de proteínas, promovendo a hidrólise de nucleotídeos em proteínas que atuam como sinalizadores celulares, possivelmente envolvido no início da ativação da

resposta de resistência em plantas (Hammond-Kosack e Parker, 2003; van der Biezen e Jones, 1998).

O domínio TIR apresenta similaridade com domínios de proteínas presentes em animais (Toll e Il-1R) e parece ter a função de transdução de sinal (Dinesh-Kumar et al., 2000), além de reconhecimento do patógeno (Martin et al., 2003).

Além de proteínas com domínios NBS-LRR, existem outras proteínas R da família serina treonina quinase (STK) (Brueggeman et al., 2002), como a codificada pelo gene *Pto* de tomate (Martin et al., 2003); proteínas com domínio LRR extracitoplasmático (eLRR) ancorado a domínio transmembrana (TM) (Jones et al., 1994); e proteínas da família eLRR-TM-quinase, como o produto do gene *Xa21* de arroz (Song et al., 1995). Domínios quinases estão envolvidos com a via de transdução de sinal, sendo extremamente importantes na ativação dos mecanismos de defesa da planta (Hammond-Kosack e Jones, 1997).

Outras proteínas R que não pertencem às classes anteriores também têm sido relatadas, como a HC-toxina redutase, codificada pelo gene *Hm1* e capaz de inativar a toxina produzida pelo patógeno. O gene *Hm1* foi o primeiro gene de resistência de plantas clonado e caracterizado que confere resistência ao fungo *Conchliobolus carbonum* de milho (Johal e Briggs, 1992). Glicoproteínas de superfície celular que contêm receptor sinal de endocitose também não apresentam os domínios típicos descritos anteriormente (Kawchuk et al., 2001).

A análise de expressão gênica consiste numa importante ferramenta que contribui para a caracterização de genes envolvidos no mecanismo de resistência, pois possibilita a identificação de genes chaves de redes pela comparação do perfil de expressão. Os transcritos de inúmeros genes relacionados à patogênese acumulam dentro de minutos a horas do ataque pelo patógeno (Hammondkosack e Jones, 1996). Poucos minutos após o reconhecimento R-Avr, rotas complexas de sinalização são ativadas. Um elemento inicial comum dessas cascatas é a mudança transitória da permeabilidade iônica da membrana plasmática vegetal. A ativação dos genes R estimula a entrada dos íons Ca^{2+} e H^+ na célula e a saída de K^+ e Cl^- (Nümberger e Scheel, 2001). Diferentes autores têm demonstrado que genes de resistência apresentam expressão constitutiva (Milligan et al., 1998; Yoshimura et al., 1998; Thureau et al., 2003), embora genes diferencialmente expressos também têm sido caracterizados (Orsi, 2003; Meyer et al., 2009).

A maioria dos genes R apresenta-se em múltiplas cópias agrupadas no genoma formando locos complexos (Martin et al., 2003). Acredita-se que esta estrutura auxilia na geração e manutenção da diversidade dos genes R (Meyers et al., 2005). Dessa forma, a recombinação pode gerar novos alelos capazes de ativar a

resposta de defesa de novas raças do patógenos ou sequências análogas a genes de resistência.

1.5 Análogos de genes de resistência (RGAs)

Os análogos de genes de resistência (RGAs) são sequências similares a sequências de genes R, mas que ainda não possuem sua funcionalidade confirmada. Esta conservação estrutural apresenta grande interesse do ponto de vista genético, uma vez que claramente sugere que essas regiões conservadas poderiam representar sítios de relevância biológica na expressão fenotípica de genes R (Bent, 1996). Os domínios conservados entre genes R têm sido utilizados para a síntese de *primers* degenerados capazes de promover a amplificação dessas regiões em várias espécies de plantas utilizando técnicas simplificadas de PCR (Kanazin et al., 1996; Leiter et al., 1996; Yu et al., 1996).

Em diversos trabalhos foi observado que marcadores moleculares baseados em RGAs estão fortemente ligados a genes de resistência ou podem mesmo representar segmentos de genes de resistência funcionais em diferentes espécies vegetais (Hammond-Kosack e Jones, 1997; Collins et al., 2001; Mas et al., 2001; Lopez et al., 2003; Hinchliffe et al., 2005). Neste sentido, marcadores associados aos RGAs podem constituir uma ferramenta muito útil para a construção de mapas genéticos e na seleção assistida dentro de programas de melhoramento genético vegetal. Considerando que fenótipos de resistência são, muitas vezes, tardios e/ou de difícil identificação, os marcadores RGA podem representar uma importante ferramenta para a seleção de genótipos de interesse e para a identificação de genes de resistência em plantas (Tullu et al., 2006; Geffroy et al., 1999).

Em milho, Wang et al. (2007) e Xiao et al. (2007) identificaram e mapearam dezenas de RGAs em populações RILs utilizando análises *in silico* e/ou mapeamento genético convencional. Esses autores ancoraram vários RGAs em mapas genéticos saturados com marcadores microssatélites (SSRs). Com a disponibilização da sequência completa do genoma do milho (Schnable et al., 2009), novas estratégias tornaram-se possíveis visando à busca e caracterização de genes de resistência utilizando ferramentas de bioinformática. Recentemente, Liu et al. (2012) desenvolveram centenas de marcadores moleculares baseados em polimorfismos de íntrons de RGAs de milho.

Apesar da mancha branca ser de grande incidência e causar grandes perdas à produção de milho no Brasil, informações como variabilidade do patógeno e genes de resistência no hospedeiro ainda são completamente desconhecidas. Assim, tais informações são de fundamental importância para delinear estratégias de controle

epidemiológico do patógeno e para o desenvolvimento de genótipos de milho resistentes à doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K. et al. An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 258, p. 297-300, 1989.

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.

AMARAL, A. L. et al. *Phoma sorghina*, a new pathogen associated with phaeosphaeria leaf spot on maize in Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 253, p. 259, 2004.

AMARAL, A. L. et al. Fungos patogênicos causadores de manchas similares a de mancha de phaeosphaeria em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 37-38, 2005.

BEDENDO, I. P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 331-341.

BENT, A. F. Plant disease resistance genes: function meets structure. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1757-1771, 1996.

BOMFETI, C. A. et al. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot diseases using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 63-66, 2008.

BOUCHEZ, A. et al. Marker-assisted introgression of favorable alleles at Quantitative Trait Loci between maize elite lines. **Genetics**, Austin, v. 162, p. 1945-1959, 2002.

BRUEGGEMAN, R. et al. The barley stem rust-resistance gene Rpg1 is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, p. 9328-9333, 2002.

CALI, M. L. **Aspectos etiológicos e epidemiológicos do complexo mancha branca do milho**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

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

CARSON, M. L.; STUBER, C. W.; SENIOR, M. L. Quantitative trait loci conditioning resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize caused by *Phaeosphaeria maydis*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 571-574, 2005.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 83).

COLLINS, N. et al. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance. **Gene**, Amsterdam, v. 44, p. 375-381, 2001.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Consolidado e acompanhamento da Safra Brasileira 2011/2012, levantamento de agosto de 2012**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 out. 2012.

COSTA, F. M. P. **Severidade de *Phaeosphaeria maydis* e rendimento de grãos em milho (*Zea mays* L.) em diferentes ambientes e doses de nitrogênio**. 2001. 119 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

COSTA, R. V. Controle químico da mancha branca através de fungicidas: análise da situação atual. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 27.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 3.; WORKSHOP SOBRE MANEJO E ETIOLOGIA DA MANCHA BRANCA DO MILHO, 2008, Londrina. **Agroenergia, produção de alimentos e mudanças climáticas: desafios para milho e sorgo: trabalhos e palestras**. [Londrina]: IAPAR; [Sete Lagoas]: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 1 CD-ROM.

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Doenças. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 1).

COSTA, R. V. et al. Viabilidade técnica e econômica da aplicação de estrobilurinas em milho. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, p. 246-254, 2012.

COTA, L. V. et al. First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, Toowoomba, v. 5, p. 120-122, 2010.

COTHER, E. J. et al. An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananas* and the first record of this pathogen on rice in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Toowoomba, v. 33, p. 495-503, 2004.

COUTINHO, T. A. et al. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids and clones in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, p. 20-25, 2002.

COUTINHO, T. A.; VENTER, S. N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 325-335, 2009.

DAS, S. N.; PRODHAN, H. S.; KAISER, S. A. Further studies on the inheritance of resistance to phaeosphaeria leaf spot of maize. **Indian Journal of Mycology Research**, v. 27, p. 127-130, 1989a.

DAS, S. N.; SINHAMAHAPATRA, S. P.; BASAK, S. L. Inheritance of resistance to phaeosphaeria leaf spot of maize. **Annals of Agricultural Research**, v. 10, p. 182-184, 1989b.

De WIT, P. L. G. M. Fungal avirulence genes and plant resistance genes: unraveling the molecular basis of gene-for-gene Interactions. **Advances in Botanical Research**, London, v. 21, p. 147-185, 1995.

DINESH-KUMAR, S. P.; BAKER, B. Alternatively spliced *N* resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, p. 1908-1913, 2000.

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

FAO. **Statistical Database**. 2010. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 15 out. 2012.

FERNANDES, F. T.; LIMA, P.; SANS, L. M. A.; PINTO, N. F. J. A. Influência de fatores climáticos na ocorrência de *Phyllosticta* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 309, 1995. Suplemento.

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

FIDELIS, R. R. et al. Reação de cultivares de milho à mancha de *Phaeosphaeria* em estresse de nitrogênio. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, p. 27-34, 2003.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.

FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. A. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. **The Plant Health Instructor**, 2008. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/OverviewOfPlantDiseases.aspx>> . Acesso em: 10 out. 2012. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.

GEFFROY, V. et al. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 12, p. 774-784, 1999.

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**, St. Paul, v. 81, p. 1096, 1997.

GONÇALVES, R. M. **Estudos etiológicos da Mancha branca do milho e identificação de hospedeiros alternativos de *P. ananatis***. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

GUIMARÃES, P. S. et al. Capacidade combinatória para resistência à mancha branca em linhagens endogâmicas de milho. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 35, p. 282-287, 2009.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Response to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRISSEM, D.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1997. p. 1102-1156.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 177-193, 2003.

HWANG, C. F. et al. Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the *Mi* gene product in regulation of localized cell death. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 1319-1329, 2000.

HINCHLIFFE, D. J. et al. Resistance gene analogue markers are mapped to homeologous chromosomes in cultivated tetraploid cotton. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, p. 1074-1085, 2005.

JIA, Y. et al. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **EMBO Journal**, Oxford, v. 19, p. 4004-4014, 2000.

JOHAL, G. S.; BRIGGS, S. P. Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. **Science**, Washington, v. 258, p. 985-987, 1992.

JONES, D. A. et al. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science**, Washington, v. 266, p. 789-799, 1994.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, p. 11746-11750, 1996.

KAWCHUK, L. M. et al. Tomato *Ve* disease resistance gene encode cell surface-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, p. 6511-6515, 2001.

KIDO, K. et al. Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Dordrecht, v. 74, p. 302-312, 2008.

KNOGGE, W. Molecular basis of specificity in host/fungus interactions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 102, p. 807-816, 1996.

KOBE, B.; KAJAVA, A. V. When protein folding is simplified to protein coiling: The continuum of solenoid protein structures. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 25, p. 509-515, 2001.

KRAWCZYK, K. et al. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, p. 807-811, 2010.

LANZA, F. E. **Mancha branca do milho**: etiologia e resistência de genótipos. 2009. 32 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

LEISTER, D. et al. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nature Genetics**, New York, v. 14, p. 421-429, 1996.

LIU, H. et al. Genome-scale identification of resistance gene analogs and the development of their intron length polymorphism markers in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 29, p. 4437-4447, 2012.

LOPES, M. T. G. **Mapeamento de genes de resistência a mancha de Phaeosphaeria em milho**. 2003. 117 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LOPES, M. T. G. et al. Controle genético da resistência a mancha de *Phaeosphaeria* em milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 605-611, 2007.

LOPEZ, C. E. et al. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 88-95, 2003.

MALAGI, G. et al. Elaboração e validação da escala diagramática para avaliação da mancha branca do milho. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 797-804, 2011.

MARTIN, G. B.; BOGDANOVE, A. J.; SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 23-61, 2003.

MAS, J. G. et al. Cloning and mapping of resistance gene homologues in melon. **Plant Science**, Limerick, v. 161, p. 165-172, 2001.

MEYER, J. D. F. et al. Identification and analyses of candidate genes for Rpp4-mediated resistance to Asian soybean rust in soybean. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 150, p. 295-307, 2009.

MEYERS, B. C.; KAUSHIK, S.; NANDETY, R. S. Evolving disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 129-134, 2005.

MILLIGAN, S. B. et al. The root knot resistance gene *M1* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1307-1319, 1998.

MOREIRA, J. U. V. **Mapeamento de QTLs para reação a mancha de *Phaeosphaeria* em milho**. 2004. 86 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MOREIRA, J. U. V. et al. QTL mapping for reaction to *Phaeosphaeria* leaf spot in a tropical maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 119, p. 1361-1369, 2009.

NÜRNBERGER, T.; SCHEEL, D. Signal transmission in the plant immune response. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, p. 372-379, 2001.

ORSI, C. H. **Identificação e análise de expressão de sequências de genes tipo RGA em espécies de coffeea resistentes e susceptíveis ao nematóide *Meloidogyne exigua***. 2003. 100 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

PARENTONI, S. N. et al. Efeito de níveis de nitrogênio sobre a severidade da doença foliar causada por *Phaeosphaeria maydis* em milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 27.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 3.; WORKSHOP SOBRE MANEJO E ETIOLOGIA DA MANCHA BRANCA DO MILHO, 2008, Londrina. **Agroenergia, produção de alimentos e mudanças climáticas: desafios para milho e sorgo: trabalhos e palestras**. [Londrina]: IAPAR; [Sete Lagoas]: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 1 CD-ROM.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

PEGORARO, D. G. et al. Herança da resistência à mancha foliar de feosféria em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 329-336, 2002.

PÉREZ-Y-TERRÓN, A. et al. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize in Mexico. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 4, p. 96-99, 2009.

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

SCHUELTER, A. R. et al. Controle genético da resistência do milho à mancha por *Phaeosphaeria*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 2, p. 46-52, 2003.

SIBIYA, J. et al. Combining ability analysis for *Phaeosphaeria* leaf spot resistance and grain yield in tropical advanced maize inbred lines. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 120, p. 86-93, 2011.

SILVA, H. P. **Genética da resistência à *Phaeosphaeria maydis* em milho**. 2002. 105 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

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

SONG, W. Y. et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. **Science**, Washington, v. 270, p. 1804-1806, 1995.

STASKAWICZ, B. J. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, Washington, v. 268, p. 661-667, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THURAU, T. et al. The promoter of the nematode resistance gene Hs1pr8_1 activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris L.*) and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, p. 643-660, 2003.

TULLU, A. et al. A quantitative-trait locus for resistance to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) map close to a gene for resistance to anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) in lentil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 28, p. 588-595, 2006.

VAN DER BIEZEN, E. A.; JONES, J. G. D. The NBARC domains: a novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Current Biology**, London, v. 8, p. 226-228, 1998.

WANG, G. X. et al. Mapping of defense response gene homologs and their association with resistance loci in maize. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 1580-1598, 2007.

YOSHIMURA, S. et al. Expression of Xa21, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 1663-1668, 1998.

YU, Y. G.; BUSS, G. R.; MAROOF, M. A. S. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, p. 11751-11756, 1996.

XIAO, W. et al. Mapping of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 115, p. 201-508, 2007.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho consiste na detecção e estudo da diversidade genética da bactéria *P. ananatis*, além da identificação e caracterização de regiões genômicas associadas com a resistência à mancha branca em milho.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um teste diagnóstico para identificação do patógeno *P. ananatis* de forma rápida e com custo reduzido.
- Avaliar a diversidade genética da bactéria *P. ananatis* isolada de lesões típicas da mancha branca em milho, sorgo e capim-colchão.
- Mapear QTLs de resistência e RGAs associados com a mancha branca em milho tropical.
- Caracterizar e quantificar a expressão de RGAs co-localizados com regiões genômicas associadas com a resistência à mancha branca do milho.

3. CAPÍTULO 1

Artigo publicado no periódico "Journal of Phytopathology"

Detection and Molecular Diversity of *Pantoea ananatis* Associated with White
Spot Disease in Maize, Sorghum and Crabgrass in Brazil

Embrapa Maize and Sorghum, Sete Lagoas, MG, Brazil; Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Detection and Molecular Diversity of *Pantoea ananatis* Associated with White Spot Disease in Maize, Sorghum and Crabgrass in Brazil

UBIRACI GOMES DE PAULA LANA^{1,2}, ELIANE APARECIDA GOMES¹, DAGMA DIONÍSIA SILVA¹, RODRIGO VERAS COSTA¹, LUCIANO VIANA COTA¹, DOUGLAS FERREIRA PARREIRA¹, ISABEL REGINA PRAZERES SOUZA¹ and CLAUDIA TEIXEIRA GUIMARÃES^{1,2}

Authors' addresses: ¹Embrapa Maize and Sorghum, PO Box 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brazil; ²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, PO Box 486, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil (correspondence to C. T. Guimarães. E-mail: claudia@cnpms.embrapa.br)

Received September 19, 2011; accepted April 18, 2012

Keywords: *Pantoea ananatis*, maize white spot disease, molecular detection, genetic diversity, Brazil

Abstract

Bacteria of the genus *Pantoea* have become important plant pathogens worldwide in recent years. *Pantoea ananatis* was reported as the cause of maize white spot, a serious maize disease in Brazil, causing significant yield losses. However, very little information is available about how to detect this pathogen, its genetic variability and the putative alternative hosts in maize-growing areas. To address these issues, we implemented a rapid and efficient PCR-based method to identify *P. ananatis* isolated from leaves showing white spot symptoms and evaluated its genetic diversity in maize, sorghum and crabgrass. Of the 29 bacteria isolated from typical water-soaked lesions of white spot disease that produced yellow colonies, 15 isolates were identified as *P. ananatis* by 16S rDNA sequencing and correctly detected by the PCR reaction, amplifying a specific fragment of the ice nucleation gene (*ina*). These *P. ananatis* isolates included 13 from maize, one from sorghum and one from crabgrass, while the other 14 yellow colony isolates were from other bacterial species, including two *Pantoea* species (*Pantoea dispersa* and *Pantoea agglomerans*) that were not amplified by the *ina* primers. These results indicate that the optimized PCR assay can be used to detect *P. ananatis* isolated from white spot lesions and could be used as a large-scale and cost-effective method of detecting this pathogen in leaf lesions on maize and other grasses. All isolates were evaluated for hypersensitive response (HR) on tobacco, revealing that some *P. ananatis* were able to induce HR. The high genetic variability revealed by rep-PCR did not differentiate the *P. ananatis* isolates based on their hosts or HR reaction. The detection, characterization and diversity of *P. ananatis* from maize, sorghum and crabgrass in our study can be applied in understanding epidemiology and designing control strategies for maize white spot disease in Brazil.

Introduction

The high incidence and severity of maize white spot disease has contributed to a significant reduction in maize yield in Brazil since the 1990s (Fernandes and Oliveira 1997). Under favourable environmental conditions, this disease causes leaf senescence and a reduction in grain size and weight, resulting in yield losses up to 63% in susceptible genotypes (Pinto 1995; Pinto et al. 1997). Disease symptoms begin with slight chlorosis and the development of water-soaked spots on the leaf surface, which become necrotic and straw-coloured (Paccola-Meirelles et al. 2001). Currently, the most sustainable and effective method for white spot disease control is the development of maize resistant varieties (Schuelter et al. 2003).

The cause of this disease was initially attributed to *Phaeosphaeria maydis*, a filamentous fungus, which was detected in late lesions of maize white spot (Fantin 1994). However, in later studies, the bacterium *Pantoea ananatis* was isolated from lesions at initial stages of development, the so-called water-soaked lesions (Paccola-Meirelles et al. 2001; Bomfeti et al. 2008). *Pantoea ananatis* was also isolated from maize white spot lesions in Mexico (Pérez-y-Terrón et al. 2009), Argentina (Alippi and López 2010) and Poland (Krawczyk et al. 2010), and this bacterium is now considered the causal agent of white spot disease.

Pantoea ananatis infects a wide range of economically important crops worldwide and is emerging as a pathogen of increasing importance due to its high virulence in new monocotyledonous and dicotyledonous hosts (Coutinho and Venter 2009). *Pantoea ananatis* was reported in asymptomatic crabgrass leaves (Gitaitis et al. 2002) and in sorghum leaf lesions showing white spot symptoms (Cota et al. 2010). This species was also isolated from maize kernels (Rijavec et al. 2007) and from the rhizosphere of P-efficient maize

genotypes (Oliveira et al. 2009). *Pantoea ananatis* is a gram-negative, non-spore forming bacterium that produces bright yellow colonies in culture media. It is one of the few bacteria species isolated from plants that carry the ice nucleation gene (*ina*) (Abe et al. 1989; McCorkle 2009). The complete genome sequence of *P. ananatis* strain LMG20103, a highly virulent eucalyptus pathogen, is currently available (De Maayer et al. 2010); however, the epidemiology of diseases caused by this species on different hosts remains unknown (Coutinho and Venter 2009). This knowledge gap and the wide spectrum of potential hosts for this pathogen make maize white spot a difficult plant disease to control.

To evaluate the dynamics of the maize white spot pathogen in Brazil, we implemented and validated a rapid and cost-effective method to detect *P. ananatis* isolated from typical water-soaked lesions from maize and from other putative hosts and tested their hypersensitive response (HR) on tobacco leaves. In addition, the genetic variability of isolates from maize, sorghum and crabgrass associated with white spot disease was accessed by rep-PCR analysis.

Material and Methods

Bacterial isolates and culture conditions

Typical water-soaked lesions of white spot disease were collected from maize, sorghum and crabgrass (*Digitaria* spp.) leaves in maize-producing areas at Embrapa Maize and Sorghum, Sete Lagoas, Minas Gerais State, Brazil. Leaf samples were washed with neutral soap, and all lesions were then cut and treated with 70% (v/v) ethanol for 1 min, 2% (w/v) chloramine T for 4 min, 70% (v/v) ethanol for 30 s, and finally washed three times for 30 s in sterilized water. Lesion segments were fragmented with a sterile scalpel and transferred to trypticase soy agar (TSA) medium with 50 µg/ml cyclohexamine. Bright yellow-coloured bacterial colonies were most frequently observed after 24 h of culture at 28°C. After sequential subcultures, 27 single colonies independently isolated from maize leaves and two colonies isolated from sorghum and crabgrass showing different yellow tonalities were selected for molecular analysis. For long-term storage, bacterial cells were collected, preserved in 30% (v/v) glycerol and maintained at -80°C. The *P. ananatis* isolate from sorghum was the same as that reported by Cota et al. (2010), which was demonstrated to cause white spot disease in this crop. This pathogenic isolate is maintained in the Collection of Plant Pathogens of Embrapa Maize and Sorghum (PA 033.10); its 16S rDNA was partially sequenced and deposited in GenBank (HQ333482), being considered as reference isolate.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from exponential-phase bacterial cells grown in trypticase soy broth (TSB) medium incubated at 28°C for 12 h. Cells were harvested by centrifugation at 6000 g for 10 min and

resuspended in 567 µl of Tris-HCl EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA, pH 8.0). Alkaline lysis was performed with 30 µl of 10% (w/v) sodium dodecyl sulphate and 3 µl of 20 mg/ml proteinase K (Sigma, St Louis, MO, USA) using a procedure adapted from Ausubel et al. (1987). After 1 h incubation at 37°C, 100 µl of 5 M NaCl was added along with 80 µl of CTAB/NaCl solution [10% (w/v) CTAB in 0.7 M NaCl] to complex polysaccharides. After 10-min incubation at 65°C, the samples were purified using an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1), followed by centrifugation at 10 000 g for 5 min. The supernatant was transferred to a new tube and purified by adding an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1) followed by centrifugation at 10 000 g for 5 min. Then, 0.6 volumes of isopropanol were used to precipitate the DNA after incubation at -20°C overnight. Samples were centrifuged at 10 000 g for 5 min; the DNA pellet was washed with 100 µl cold 70% (v/v) ethanol and dried under vacuum. The purified DNA was resuspended in 100 µl of TE buffer containing 0.2 mg/mL RNase A.

PCR assay to detect *Pantoea ananatis*

Multiplex PCR reactions were carried out using a final volume of 20 µl containing the primers for the *ina* gene and 16S rDNA, as an internal control. The primers for the *ina* gene were *inaF* (GGG ATC GCA AGC AAG CTC TGG) and *inaR* (GCG ATT ATT CTT CGG GTT T), which were developed for *P. ananatis* detection in melon (Kido et al. 2008). Primer sequences for 16S rDNA were 968F (GAA CGC GAA GAA CCT TAC) and 1492R (TGA CTG ACT GAG GYT ACC TTG TTA CGA CTT) (Lane 1991; Nubel et al. 1996). The reaction mix contained 30 ng of DNA or 1 µl of bacterial cell culture in TSB medium (the same as that used for DNA extraction), 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.001% (w/v) gelatin, 0.5 µM of each primer, 0.125 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 5% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) and 0.5 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR amplification profile was 95°C for 2 min followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s, then a final elongation step of 72°C for 5 min. Amplified fragments were resolved by electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gel.

DNA sequencing

The PCR reaction was performed in a total volume of 50 µl, containing 30 ng of bacterial DNA, 1.5 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen), 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.001% (w/v) gelatin, 0.125 mM dNTP, 1% (v/v) formamide and 0.4 µM of the primers 968F and 1401R (GCG TGT GTA CAA GAC CC) (Lane 1991; Nubel et al. 1996). Amplification conditions were 94°C for 2 min followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min, then a final elongation step of 72°C for 10 min. PCR products were purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced

using the ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). BLASTN program (Altschul et al. 1997) was used to search NCBI sequence databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) to confirm bacterial species identity. For confirmation, the *ina* gene fragment of one sample was removed from the agarose gel and sequenced as described above.

Hypersensitive response (HR) on tobacco

All isolates were inoculated into tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) leaves to evaluate their ability to induce HR. The isolates were incubated individually at 37°C for 24 h in yeast peptone medium (YP) broth [0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) peptone; pH 6.8] by shaking at 120 rpm. The concentration of bacterial cells was adjusted to approximately 10⁹ CFU/ml before inoculation into fully expanded tobacco leaves using a hypodermic syringe. The needle was inserted into interveinal regions, and the leaf panels were flooded with the bacterial suspension. A negative control containing only YP broth was included in each leaf. Tobacco plants were maintained in greenhouse at approximately 30°C with natural day and night light cycles. A positive HR reaction was recorded when the inoculated leaf tissue collapsed or light brown necrosis occurred within 48 h after inoculation. The isolate 09 that demonstrated HR-like reaction was included in all inoculated leaves as a positive control. Each inoculation was repeated at least three times to confirm the results.

rep-PCR

rep-PCR reactions were carried out in a final volume of 20 µl containing 30 ng of DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.001% (w/v) gelatin, 0.5 µM of each primer, 0.125 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂ and 0.5 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen). The primers BOX, ERIC and REP used were as follows: BOX1R (CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G), ERIC1R (ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C), ERIC2R (AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G), REP1R-I (III ICG ICG ICA TCI GGC) and REP2-I (ICG ICT TAT CIG GCC TAC) (Versalovic et al. 1991, 1994). The amplification profile involved one cycle of 3 min at 95°C, 40 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 45°C and 3 min at 72°C, and finally 10 min at 72°C. PCR products were loaded on a 1.5% (w/v) agarose gel and electrophoresed for 2 h at 100 V. Amplification fragments were visualized after staining the gel with ethidium bromide (1 µg/ml), and the fingerprints were analysed using BIO NUMERICS version 6.0 software (Applied Maths, St. Martens-Latem, Belgium). Digitalized gel images were converted and normalized using the 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). rep-PCR patterns were integrated, and the similarity in fingerprint patterns was calculated using the pairwise Pearson's product-moment correlation

coefficient (*r*-value, represented in % similarity), using whole densitometric curves of the fingerprints and an *r*-value of 1 is equivalent to 100% similarity (Hane et al. 1993). Cluster analysis of the pairwise similarity values was performed using the UPGMA algorithm.

Results

Phenotypic selection of *Pantoea ananatis*

Lesions on maize, sorghum and crabgrass leaves with an ellipsoidal to irregular shape, a reddish brown border and chlorotic centre were considered as symptomatic of white spot disease in the field. The frequency of lesions on maize leaves was higher than in sorghum and crabgrass, although symptomatic crabgrass was largely observed in maize production areas (Fig. 1a-c).

After microorganisms isolation from leaf lesions, colonies with different colour patterns were observed growing on solid medium (TSA), ranging from white to dark yellow. As *P. ananatis* produces a yellow pigment in culture, and there have been no reports of bacteria that form white colonies causing white spot disease, 29 isolates showing different yellow tonalities were selected for further molecular analysis (Fig. 1d). Of these, 27 colonies were isolated from maize, one from sorghum and one from crabgrass.

Molecular detection of *Pantoea ananatis* from symptomatic leaves of maize, sorghum and crabgrass

A multiplex PCR reaction was implemented using a primer pair previously developed to amplify a fragment of the *ina* gene by Kido et al. (2008) combined with primers for 16S rDNA, as an internal control. Of the 29 yellow-coloured bacterial isolates from symptomatic white leaf spot lesions, 15 (52%), including 13 from maize, one from sorghum and one from crabgrass, showed the presence of the 343 bp *ina* gene fragment. All 29 reactions amplified the 16S rDNA fragment at 524 bp, confirming the effectiveness of the internal control in the multiplex PCR assay (Fig. 2). The amplification products were identical when employing both isolated DNA and bacterial cell culture, the latter being far simpler and quicker to use (Fig. 2a,b).

The amplified 343 bp *ina* gene fragment from isolate 01 was sequenced, showing 99% sequence identity with the published *ina* gene from *P. ananatis* (GenBank accession D14992.1). All 29 isolates were identified by 16S rDNA partial sequence in comparison with GenBank, showing 95–99% sequence identity with bacterial species (Table 1). Fifteen isolates were identified as *P. ananatis*, and these were coincident with the bacterial colonies that showed positive PCR results for the *ina* gene (Fig. 2). The other 14 isolates (48%) were identified as different endophytic bacterial species, including *Acinetobacter baylyi*, *Enterobacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* and two different *Pantoea* species: *Pantoea dispersa* and *Pantoea agglomerans*. None of the species, other than *P. ananatis*, was amplified by the *ina* gene primers, confirming

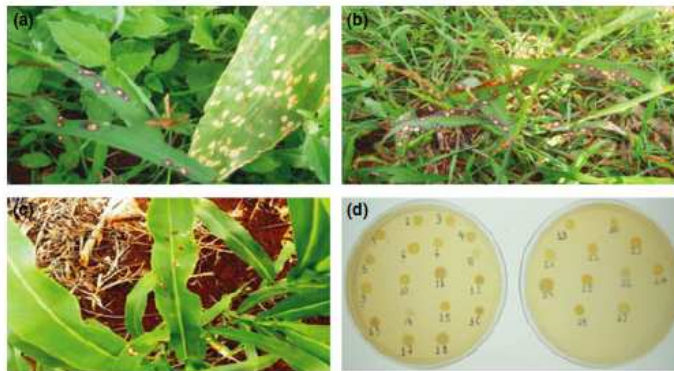


Fig. 1 Grasses with similar symptoms of the maize white spot disease and bacterial colonies isolated from the leaf lesions. (a) Maize and crabgrass. (b) Crabgrass. (c) Sorghum. (d) Bacterial isolates from white spot lesions of maize (1–26 and 28), crabgrass (27) and sorghum (29) on TSA medium

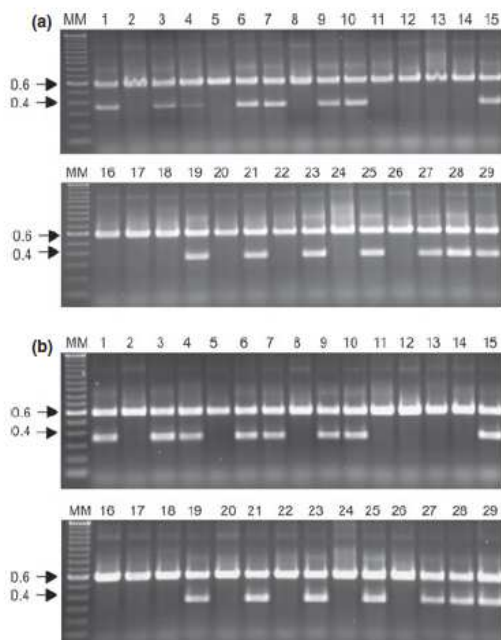


Fig. 2 Multiplex PCR reaction profiles showing the amplification products of *ina* (ice nucleation) gene fragment at 343 bp and 16S rDNA internal control (524 bp) for the bacterial isolates from white leaf spot lesions of maize (1–26 and 28), crabgrass (27) and sorghum (29). (a) Amplification pattern using bacterial cell culture and (b) extracted DNA. Arrowheads indicate the target fragments and MM is the 1 kb DNA ladder

the specificity of this PCR assay for the detection of *P. ananatis* isolated from white spot lesions.

Hypersensitive response on tobacco leaves

Plant tissue at the infiltrated area with bacterial suspension started to collapse after 24 h, followed by necrosis within 48 h. In contrast, the leaves treated with YB medium always showed no symptoms, which was considered as a negative control (Fig. 3). Among

all 29 isolates, 26 generated consistent responses on tobacco leaves, including 11 isolates showing HR-like reaction (Table 1). Of the 15 *P. ananatis* positively detected by the PCR reaction using *ina* fragment, six were able to induce an HR, whereas seven showed no symptoms after inoculation, including the pathogenic isolate from sorghum. On the other hand, five isolates that were considered as endophytic bacteria such as *P. agglomerans*, *P. putida* and *Enterobacter* ssp. also induced HR on tobacco leaves.

Assessing the genetic diversity of *Pantoea* species by rep-PCR

Genetic diversity of 18 *Pantoea* isolates, including 15 of *P. ananatis*, two of *P. agglomerans* and one of *P. dispersa*, was assessed by rep-PCR fingerprinting. ERIC, REP and BOX primers generated DNA fragments ranging from 0.3 to 3.5 kb in size, which varied from 8 to 12 fragments for ERIC, 7–14 for REP and 5–13 fragments for BOX per isolate (Fig. 4). Complex fingerprinting patterns with multiple bands of various intensities were obtained, and each isolate presented a unique fingerprint profile. Integrated analysis of rep fingerprinting revealed considerable genetic diversity among *P. ananatis* isolates and within *Pantoea* species (Fig. 4).

A major group was composed of 14 *P. ananatis* iso-genetic similarity (Cluster I), whereas only the *P. ananatis* isolate 04 was grouped with *P. dispersa* in Cluster II. *P. agglomerans* isolates were the most diverse, forming the third cluster with approximately 30% genetic similarity (Fig. 4).

Discussion

A specific PCR assay to identify *Pantoea ananatis* in grasses

The increased importance of maize white spot disease has stimulated studies to identify its cause in maize and other grasses, which has been assigned to *P. ananatis* (Paccola-Meirelles et al. 2001; Pérez-y-Terrón et al. 2009; Alippi and López 2010). *Pantoea ananatis* is one of the several *Pantoea* species that forms yellow colonies in culture medium due to carotenoid production (Grimont and Grimont 2005).

Table 1
Species identification based on 16S rDNA sequence identity of bacterial isolates from white leaf spot lesions in maize, sorghum and crabgrass

Isolate	Host	Species	GenBank access	E-value	Identity (%)	References ^a	<i>ina</i> PCR	HR ^b
01	Maize	<i>Pantoea ananatis</i>	AB297969.1	0.0	96	Kido et al. (2008)	+	ND
02	Maize	<i>Pseudomonas putida</i>	AY456706.1	0.0	97	Rezzonico et al. (2004)	-	+
03	Maize	<i>P. ananatis</i>	CP001875.1	0.0	98	De Maayer et al. (2010)	+	-
04	Maize	<i>P. ananatis</i>	GU324769.1	0.0	99	Yan et al. (2010)	+	ND
05	Maize	<i>Pantoea dispersa</i>	FJ611865.1	0.0	99	Rezzonico et al. (2009)	-	-
06	Maize	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	97	Kido et al. (2008)	+	+
07	Maize	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	98	Kido et al. (2008)	+	-
08	Maize	<i>Pantoea agglomerans</i>	FJ611809.1	0.0	99	Rezzonico et al. (2009)	-	+
09	Maize	<i>P. ananatis</i>	FJ611814.1	0.0	99	Rezzonico et al. (2009)	+	+
10	Maize	<i>P. ananatis</i>	CP001875.1	0.0	99	De Maayer et al. (2010)	+	+
11	Maize	<i>Uncultured bacterium</i>	EU842007.1	0.0	99	Eilmus and Heil 2009	-	+
12	Maize	<i>Acinetobacter baylyi</i>	EF178435.1	0.0	99	Yang et al. (2008)	-	-
13	Maize	<i>A. baylyi</i>	EU604244.1	0.0	98	Chen et al. (2008)	-	-
14	Maize	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AM905852.2	0.0	95	Mulet et al. (2008)	-	-
15	Maize	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	99	Kido et al. (2008)	+	-
16	Maize	<i>A. baylyi</i>	EU604244.1	0.0	99	Chen et al. (2008)	-	-
17	Maize	<i>Uncultured bacterium</i>	AB460252.1	0.0	99	Ikeda et al. (2009)	-	-
18	Maize	<i>Uncultured bacterium</i>	AB460252.1	0.0	99	Ikeda et al. (2009)	-	-
19	Maize	<i>P. ananatis</i>	CP001875.1	0.0	99	De Maayer et al. (2010)	+	+
20	Maize	<i>P. putida</i>	HM192789.1	0.0	99	-	-	ND
21	Maize	<i>P. ananatis</i>	CP001875.1	0.0	98	De Maayer et al. (2010)	+	+
22	Maize	<i>P. agglomerans</i>	FJ611807.1	0.0	99	Rezzonico et al. (2009)	-	+
23	Maize	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	99	Kido et al. 2008	+	-
24	Maize	<i>Enterobacter</i> spp.	GQ478275.1	0.0	99	Collavino et al. (2010)	-	+
25	Maize	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	99	Kido et al. (2008)	+	+
26	Maize	<i>Uncultured bacterium</i>	DQ532292.1	0.0	99	Moissl et al. (2007)	-	-
27	Crabgrass	<i>P. ananatis</i>	AB297969.1	0.0	99	Kido et al. (2008)	+	-
28	Maize	<i>P. ananatis</i>	CP001875.1	0.0	99	De Maayer et al. (2010)	+	-
29	Sorghum	<i>P. ananatis</i>	HQ333482.1	0.0	100	Cota et al. (2010)	+	-

ND, not determined; HR, hypersensitive response. ^aPublic citations of the hits found in the GenBank, which were used to identify each species by sequence comparison; ^bHypersensitive response on tobacco leaves.

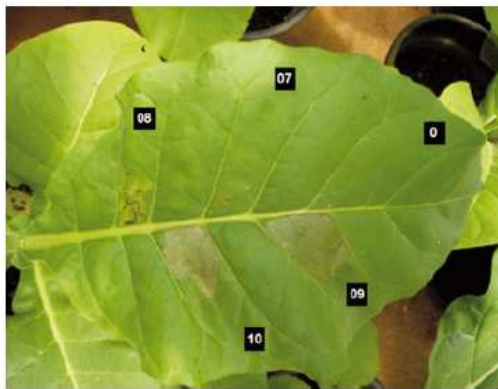


Fig. 3 Reaction of tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) 48 h after infiltration with YB medium (0) and some bacterial isolates (07, 08, 09, 10)

Despite the fact that white mutants of *P. ananatis* occur in collections, our first selection criterion was the yellow colony phenotype because white colony endophytes were also isolated from maize white spot lesions by Paccola-Meirelles et al. (2001), and our goal was to detect the pathogen of these lesions. The colour phenotype of colonies was important but not enough to identify this species in white spot lesions, and we

showed that only 48% of the bacteria isolated from yellow colonies were *P. ananatis*.

To specifically identify *P. ananatis* in white spot lesions, we validated a multiplex PCR reaction based on the amplification of a fragment of the *ina* gene, which was developed to detect this pathogen in melon internal fruit rot (Kido et al. 2008). The optimized PCR assay specifically detected *P. ananatis* isolated from white spot lesions of maize, sorghum and crabgrass, which were confirmed by 16S rDNA sequence comparison.

Ice nucleation activity is shared by some bacterial species; however, six different genes encoding ice nucleation proteins have been sequenced from *Pseudomonas fluorescens* (*inaW*; Warren et al. 1986), *Pseudomonas syringae* (*inaZ*; Green and Warren 1985), *Xanthomonas campestris* (*inaX*; Zhao and Orser 1990), *P. agglomerans* (*ice*; Warren and Corotto 1989) and *Pantoea ananatis* (*inaA*; Abe et al. 1989 and *inaU*; Michigami et al. 1994). Other bacteria carrying ice nucleation genes, such as *Pseudomonas* spp. and *P. agglomerans*, were also isolated in our experiment without the amplification of the *ina* gene fragment, which is strong evidence of the specificity of this PCR reaction to *P. ananatis*. All *P. ananatis* isolates tested for *ina* PCR to date, including 96 from different crops described by Kido et al. (2008, 2010) and the 15 isolates from maize, sorghum and crabgrass white spot lesions reported in our study, showed positive results. These

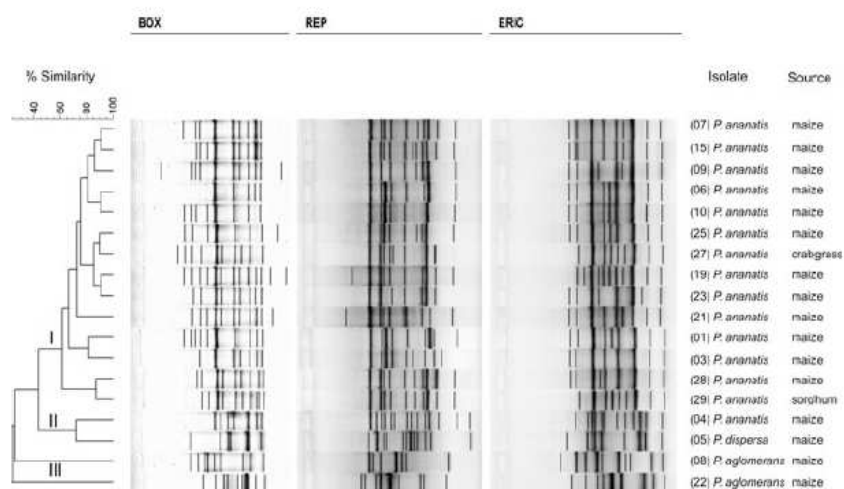


Fig. 4 Dendrogram showing the *Pantoea* isolates from leaf lesions on maize, sorghum and crabgrass after cluster analysis of rep-PCR primers using the UPGMA method

results are a robust indication that this PCR assay is a powerful tool to detect *P. ananatis* in different crops. Additionally, the multiplex PCR reaction validated here was optimized for cell culture media, which is an easier and more cost-effective way to detect *P. ananatis* in white spot disease lesions from maize and other putative hosts, than the sequencing of housekeeping genes proposed by Brady et al. (2008) to differentiate all current *Pantoea* spp.

Pantoea ananatis in white spot lesions from maize, sorghum and crabgrass

In addition to the bright yellow colony-forming bacteria, some white colonies and other bacteria were isolated from the water-soaked lesions in maize, sorghum and crabgrass. Moreover, white colonies were isolated from maize white spot lesions by Paccola-Meirrelles et al. (2001), indicating that other bacteria can be present in these lesions. It would be expected once the entry points for pathogenic bacteria can also be used by the endophytic ones, which could be able to colonize the internal leaf tissues (Kelemu et al. 2011). *Pantoea ananatis* was also isolated in typical sorghum and crabgrass white spot lesions, confirming the existence of putative alternative hosts for this pathogen. Crabgrass, one of the most frequent weeds found in maize fields throughout the overseasoning and cropping season in Brazil (Pasqualetto et al. 2001; Duarte et al. 2007), has been reported to be a host for *P. ananatis* in onion fields in the USA (Gitaitis et al. 2002). Recently, it was found that *P. ananatis* isolated from crabgrass was able to induce white spot disease in maize (Silva et al. 2010). Additionally, *P. ananatis* was reported to be pathogenic in sorghum by artificial inoculation (Azad et al. 2000) and was shown to cause white spot disease in sorghum under field conditions in Brazil (Cota et al. 2010). Avoidance and eradication of

the initial inoculum are probably the most appropriate disease management strategies recommended for control of *P. ananatis* and other phytopathogenic bacteria (Coutinho and Venter 2009). Thus, the presence of this bacterium in sorghum and crabgrass may have considerable epidemiological significance and function as an important inoculum source, complicating the disease control strategies in maize-producing areas.

All bacteria isolated from white spot lesions were evaluated for the ability to induce HR on tobacco leaves. Six *P. ananatis* isolates produced a necrotic reaction until 48 h of inoculation. It is known that *P. ananatis* isolated from maize white spot lesions can induce HR-like reaction (Paccola-Meirrelles et al. 2001; Alippi and López 2010; Krawczyk et al. 2010). On the other hand, some *P. ananatis* including the sorghum pathogenic isolate (Cota et al. 2010) did not induced HR on tobacco. A similar response was demonstrated by pathogenic isolates from melon fruit (Kido et al. 2010), suggesting that tobacco infiltration tests are insufficient to determine the pathogenicity of *P. ananatis*. Moreover, four endophytic bacterial species also showed HR-like reaction on tobacco leaves. The present findings seem to be consistent with other research which demonstrated that three of these bacterial species are plant pathogen, such as *P. agglomerans* (Cooksey 1986; Morales-Valenzuela et al. 2007; Yang et al. 2011), *P. putida* (Gonçalves et al. 2008) and *Enterobacter* ssp. (Nishijima et al. 2007; Masyahit et al. 2009; Schroeder et al. 2010).

Genetic diversity of *Pantoea* species

rep-PCR is a DNA fingerprinting technique based on the amplification of genomic sequences between the repetitive elements conserved in prokaryotes, including repetitive extragenic palindromic (REP), enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) and BOX

elements (Versalovic et al. 1991, 1994). Each of the *Pantoea* isolates amplified by rep-PCR primers showed a unique DNA fingerprint and high genetic variability. Of the 15 *P. ananatis* isolates, 14 isolates from maize and crabgrass, as well as the sorghum pathogenic isolate reported by Cota et al. (2010) clustered in a single group (Cluster I) and showed between 65 and 90% genetic similarity (Fig. 4). The one exception was *P. ananatis* isolate 04, which was grouped with *P. dispersa* showing a genetic similarity of close to 60%. This demonstrated that genetic variability among the *P. ananatis* isolates from maize, sorghum and crabgrass white spot lesions was not related to host type or to differential reaction on tobacco leaves.

By sampling just one maize-growing area in Brazil, we found that the genetic variability of *P. ananatis* was particularly high, when compared with the ones isolated from melon fruit rot (Kido et al. 2008). These authors found that eight *P. ananatis* isolates were nearly identical when analysed by rep-PCR. Further studies on the *P. ananatis* variability from other hosts and other geographical regions, however, could be useful in designing strategies for maize white spot disease control. In accordance with these findings, we propose that it is very important that the genetic variability of this pathogen be taken into consideration in the development of maize cultivars with durable resistance.

Acknowledgements

The authors thank Cêlio Ramos das Neves and Clóvis Geraldo Ribeiro for excellent technical assistance in the field and the laboratory. This work was supported by FAPEMIG, CNPq and Embrapa.

References

- Abe K, Watabe S, Emori Y, Watanabe M, Arai S. (1989) An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity. *FEBS Lett* **258**:297–300.
- Alippi AM, López AC. (2010) First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. *Plant Dis* **94**:487.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389–3402.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Sideman JG, Smith JA, Struhl K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, Wiley, pp. 2.10–2.11.
- Azad HR, Holmes GJ, Cooksey DA. (2000) A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. *Plant Dis* **84**:973–979.
- Bomfeti CA, Souza-Pacolla EA, Massola Júnior NS, Marriel IE, Meirelles WF, Casela CR, Paccolla-Meirelles LD. (2008) Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot diseases using transmission electron microscopy and molecular techniques. *Trop Plant Pathol* **33**:63–66.
- Brady C, Cleenwerck I, Venter SN, Vancanneyt M, Swings J, Coutinho TA. (2008) Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst Appl Microbiol* **31**:447–460.
- Chen TL, Siu LK, Lee YT, Chen CP, Huang LY, Wu RC, Cho WL, Fung CP. (2008) New insight of *Acinetobacter baylyi* as a pathogen for opportunistic infection. *J Clin Microbiol* **46**:2938–2944.
- Collavino M, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM. (2010) Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol Fertil Soils* **46**:727–738.
- Cooksey G. (1986) Galls of *Gypsophila paniculata* caused by *Erwinia herbicola*. *Plant Dis* **70**:464–468.
- Cota LV, Costa RV, Silva DD, Parreira DF, Lana UGP, Casela CR. (2010) First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. *Australas Plant Dis Notes* **5**:120–122.
- Coutinho TA, Venter SN. (2009) *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Mol Plant Pathol* **10**:325–335.
- De Maayer P, Chan WY, Venter SN, Toth IK, Birch PRJ, Joubert F, Coutinho TA. (2010) Genome sequence of *Pantoea ananatis* LMG20103, the causative agent of *Eucalyptus* blight and dieback. *J Bacteriol* **192**:2936–2937.
- Duarte AP, Silva AC, Deuber R. (2007) Plantas infestantes em lavouras de milho safrinha, sob diferentes manejos, no Médio Paranapanema. *Planta Daninha* **25**:285–291.
- Eilmus S, Heil M. (2009) Bacterial associates of arboreal ants and their putative functions in an obligate ant-plant mutualism. *Appl Environ Microbiol* **75**:4324–4332.
- Fantin GM. (1994) Mancha de *Phaeosphaeria*, doença do milho que vem aumentando sua importância. *Biológico* **56**:39.
- Fernandes FT, Oliveira E. (1997) *Principais doenças na cultura do milho*. Embrapa-Circular Técnica 26. Sete Lagoas, MG, Brazil, Embrapa, pp. 80.
- Gitaitis RD, Walcott R, Culpepper S, Sanders H, Zolobowska L, Langston D. (2002) Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. *Crop Prot* **21**:983–989.
- Gonçalves RC, Lau D, Oliveira JR, Maffia LA, Cascardo JCM, Alfenas AC. (2008) Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil. *Trop Plant Pathol* **33**:180–188.
- Green R, Warren G. (1985) Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. *Nature* **317**:645–648.
- Grimont PAD, Grimont F. (2005) Genus XXIII. *Pantoea*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria, Part B: the Gamma-proteobacteria*, Vol. 2, 2nd edn. New York, Springer, pp. 713–720.
- Hane BG, Jager K, Drexler HG. (1993) The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis* **14**:967–972.
- Ikeda S, Kaneko T, Okubo T, Rallos LE, Eda S, Mitsui H, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Minamisawa K. (2009) Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. *Microb Ecol* **58**:703–714.
- Kelemu S, Fory P, Zuleta C, Ricaurte J, Rao I, Lascano C. (2011) Detecting bacterial endophytes in tropical grasses of the *Brachiaria* genus and determining their role in improving plant growth. *Afr J Biotechnol* **10**:965–976.
- Kido K, Adachi R, Hasegawa M, Yano K, Hikichi Y, Takeuchi S, Atsuchi T, Takikawa Y. (2008) Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. *J Gen Plant Pathol* **74**:302–312.
- Kido K, Hasegawa M, Matsumoto H, Kobayashi M, Takikawa Y. (2010) *Pantoea ananatis* strains are differentiated into three groups based on reactions of tobacco and Welsh onion and on genetic characteristics. *J Gen Plant Pathol* **76**:208–218.
- Krawczyk K, Kamasa J, Zwolinska A, Pospieszny H. (2010) First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. *J Plant Pathol* **92**:807–811.
- Lane DJ. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M. (eds) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester, UK, John Wiley & Sons Ltd, pp. 115–175.
- Masyahit M, Sijam K, Awang Y, Ghazali M. (2009) First report on bacterial soft rot disease on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) caused by *Enterobacter cloacae* in peninsular Malaysia. *Int J Agric Biol* **11**:659–666.
- McCorkle AM. (2009) Natural ice-nucleating bacteria increase the freezing tolerance of the intertidal bivalve *Geukensia demissa*. Internet Resource: <http://digitalcommons.conncoll.edu/biohp/3> (verified Dec 12, 2011).

- Michigami Y, Watabe S, Abe K, Obata H, Arai S. (1994) Cloning and sequencing of an ice nucleation active gene of *Erwinia uredovora*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**:762-764.
- Moissl C, Osman S, La Duc MT, Dekas A, Brodie E, DeSantis T, Venkateswaran K. (2007) Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled. *FEMS Microbiol Ecol* **61**:509-521.
- Morales-Valenzuela G, Silva-Rojas HV, Ochoa-Martínez D et al. (2007) First Report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant Dis* **91**:1368.
- Mulet M, Gomila M, Gruffaz C, Meyer JM, Palleroni NJ, Lalucat J, Garcia-Valdes E. (2008) Phylogenetic analysis and siderotyping as useful tools in the taxonomy of *Pseudomonas stutzeri*: description of a novel genomovar. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:2309-2315.
- Nishijima KA, Wall MM, Siderhurst MS. (2007) Demonstrating pathogenicity of *Enterobacter cloacae* on macadamia and identifying associated volatiles of gray kernel of macadamia in Hawaii. *Plant Dis* **91**:1221-1228.
- Nubel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**:5636-5643.
- Oliveira CA, Alves VMC, Marriel IE, Gomes EA, Scotti MR, Carneiro NP, Guimarães CT, Schaffert RE, Sá NMH. (2009) Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol Biochem* **41**:1782-1787.
- Paccola-Meirelles LD, Ferreira AS, Meirelles WF, Marriel IE, Casela CR. (2001) Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. *J Phytopathol* **149**:275-279.
- Pasqualetto A, Costa LM, Silva AA, Sedyama CS. (2001) Ocorrência de plantas daninhas na cultura do milho (*Zea mays* L.) em sucessão a culturas de safrinha no sistema plantio direto. *Pesqui Agropecu Trop* **31**:133-138.
- Pérez-y-Terrón A, Villegas MC, Cuellar ABC et al. (2009) Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize in Mexico. *Aust Plant Dis Not* **4**:96-99.
- Pinto NFJA. (1995) Produção de picnídios de *Phyllosticta* sp. "in vivo" e "in vitro" em folhas de milho tratadas com fungicidas. *Fitopatol Bras* **20**:333.
- Pinto NFJA, Fernandes FT, Oliveira E. (1997) Milho (*Zea mays* L.): Controle de Doenças. in: Vale FXR, Zambolim L. (eds) *Controle de Doenças de Plantas*. Viçosa, MG, UFV, pp. 821-864.
- Rezzonico F, Defago G, Moenne-Loccoz Y. (2004) Comparison of ATPase-encoding type III secretion system hrcN genes in biocontrol fluorescent *Pseudomonads* and in phytopathogenic proteobacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**:5119-5131.
- Rezzonico F, Smits TH, Montesinos E, Frey JE, Duffy B. (2009) Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiol* **9**:204.
- Rijavec T, Lapanje A, Demastia M, Rupnik M. (2007) Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Can J Microbiol* **53**:802-808.
- Schroeder BK, Waters TD, du Toit LJ. (2010) Evaluation of onion cultivars for resistance to *Enterobacter cloacae* in storage. *Plant Dis* **94**:236-243.
- Schuelter AR, Souza IRP, Tavares FF, Santos MX, Oliveira E, Guimarães CT. (2003) Controle genético da resistência do milho à mancha por *Phaeosphaeria*. *Rev Bras Milho Sorgo* **2**:80-86.
- Silva DD, Costa RV, Cota LV, Parreira DF, Lana UGP, Ferreira P, Nolasco AAR, Souza IRP, Marriel IE. (2010) Inoculação cruzada de isolados de *Pantoea ananatis* de milho e capim-colchão. In: Pfenning LH. (ed) *Anais do XLIII Congresso Nacional de Fitopatologia*, 2010, 15-19 August 2010. Cuiabá, MT, Brazil, pp. 127.
- Versalovic J, Koeth T, Lupski JR. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**:6823-6831.
- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* **5**:25-40.
- Warren GJ, Corotto L. (1989) The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Pseudomonas syringae*. *Gene* **85**:292-294.
- Warren GJ, Corotto L, Wolber P. (1986) Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. *Nucleic Acids Res* **14**:8047-8060.
- Yan H, Yu SH, Xie GL, Fang W, Su T, Li B. (2010) Grain discoloration of rice caused by *Pantoea ananatis* (synonym *Erwinia uredovora*) in China. *Plant Dis* **94**:482.
- Yang JH, Liu HX, Zhu GM, Pan YL, Xu LP, Guo JH. (2008) Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. *J Appl Microbiol* **104**:91-104.
- Yang KQ, Qu WW, Liu X, Liu HX, Hou LQ. (2011) First report of *Pantoea agglomerans* causing brown apical necrosis of walnut in China. *Plant Dis* **95**:773.
- Zhao J, Orser CS. (1990) Conserved repetition in the ice nucleation gene *inaX* from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Mol Gen Genet* **223**:163-166.

5. CONCLUSÃO GERAL

Em relação ao patógeno, foi implementada uma metodologia com custo reduzido para rápida detecção da bactéria *P. ananatis* a partir de lesões foliares da mancha branca. Uma elevada variabilidade genética foi verificada entre os isolados de *P. ananatis*, sendo possível agrupar conjuntamente os isolados de milho, sorgo e capim colchão. Tais resultados evidenciam possíveis hospedeiros alternativos, com implicações importantes nos estudos epidemiológicos visando estratégias de manejo da doença.

Quanto ao hospedeiro, foram mapeados QTLs associados com a resistência à mancha branca em milho, constitutivos e especificamente expressos em dois ambientes. Foram identificados QTLs com predominância de efeitos de dominância, além de interações epistáticas entre QTLs, que em conjunto, explicaram em torno de 92% da variância genotípica da resistência em cada um dos ambientes avaliados. Posteriormente, foram identificados RGAs co-localizados *in silico* com os QTLs de resistência à mancha branca, dos quais os candidatos *Pto20*, *Pto99* e *Xa26.151.4* foram geneticamente mapeados na região dos QTLs nos cromossomos 4 e 8, e foram super-expressos na linhagem resistente em condições de campo. Assim, tais informações contribuirão tanto com potenciais alvos para a seleção assistida, quanto para o delineamento de um programa de melhoramento visando o desenvolvimento de genótipos de milho mais resistentes à mancha branca.