

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

RAQUEL PINHEIRO DA MOTA

AGRESSIVIDADE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Pantoea*
ananatis E NANOPARTICULAS NO CONTROLE DA BACTÉRIA NA CULTURA DO
MILHO

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS- BRASIL
2019

RAQUEL PINHEIRO DA MOTA

AGRESSIVIDADE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Pantoea ananatis* E NANOPARTICULAS NO CONTROLE DA BACTÉRIA NA CULTURA DO MILHO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. ^a Dr. ^a Nilvanira Donizete Tebaldi

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS- BRASIL
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M917a Mota, Raquel Pinheiro da, 1994-
2019 Agressividade, caracterização molecular de isolados de *Pantoea*
ananatis e nanopartículas no controle da bactéria na cultura do milho
[recurso eletrônico] / Raquel Pinheiro da Mota. - 2019.

Orientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.4>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Agronomia. 2. Milho - Doenças e pragas. 3. Fitopatologia. 4.
Nanopartículas. 5. Milho - Cultura. 6. Bactérias fitopatogênicas. I.
Tebaldi, Nilvanira Donizete (Orient.). II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

Rejane Maria da Silva – CRB6/1925

RAQUEL PINHEIRO DA MOTA

AGRESSIVIDADE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Pantoea ananatis* E NANOPARTICULAS NO CONTROLE DA BACTÉRIA NA CULTURA DO MILHO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 05 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Alison Talis Martins Lima

UFU

Prof.^a Dr.^a Anielle Christine Almeida Silva

UFAL

Prof. Dr. Igor Souza Pereira

IFTM

Prof.^a Dr.^a Nilvanira Donizete Tebaldi
ICIAG-UFU
(Orientadora)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS- BRASIL
2019

Ao meu marido Joao Vitor Medina Faria e meu filho Samuel Medina Mota.

Aos meus pais Milton Jose Pinheiro da Mota e Roseli Lucimar Soares da Mota.

Aos meus irmãos, amigos, sogros e cunhadas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de formação profissional.

Ao meu marido João Vitor Medina Faria pelo constante apoio.

Ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal por proporcionar o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Nilvanira Donizete Tebaldi pela paciência, apoio e ensinamentos.

Aos professores Dr. Igor Souza Pereira e Dr.^a Anielle Christine Almeida Silva pela gentileza e disponibilidade em compor minha banca de defesa de dissertação.

À técnica do Laboratório Lara Caroline Borges Moreira Mota pelo auxílio, pelas sugestões e ensinamentos.

Aos amigos de Pós-Graduação, especialmente a Morgana, pelas contribuições e incentivo.

Aos demais amigos pelos momentos compartilhados, em especial Sandra.

Aos meus pais.

Aos meus sogros e cunhadas.

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

Sobretudo, agradeço a Deus.

BIOGRAFIA

Raquel Pinheiro da Mota, filha de Milton Jose Pinheiro da Mota e Roseli Lucimar Soares da Mota, nasceu dia 31 de agosto de 1994 em Lagoa Formosa- MG.

Ingressou, em março de 2012, no Curso de Agronomia na Universidade Federal de Uberlândia, concluindo-o em dezembro de 2016.

Em fevereiro de 2017, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, na área de atuação em Bacteriologia, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2019.

RESUMO

A mancha branca do milho, causada pela bactéria *Pantoea ananatis* destaca-se como uma das principais doenças foliares da cultura. Para o manejo da doença recomenda-se a utilização de genótipos resistentes e produtos químicos que não vem apresentando eficiência, portanto uma inovação tecnológica no controle químico de fitopatógenos deve ser avaliado no controle da doença. Assim, o presente trabalho teve como objetivos: avaliar a agressividade de isolados de *P. ananatis*; caracterizar molecularmente isolados de *P. ananatis* e avaliar o efeito de nanopartículas no controle da bactéria em plantas de milho. Para a avaliação da agressividade, foram utilizados nove isolados de *P. ananatis* inoculados em três genótipos de milho (DKB230, AG9025 e 2B810PW), com quatro repetições. A severidade da mancha branca das folhas foi avaliada aos 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação, usando uma escala de notas. Para caracterização molecular foram estudados 23 isolados de *P. ananatis* utilizando os primers específicos ANAF/ANAR e primer universal BOX. Para controle com nanopartículas foram utilizados nanocristais de ZnO dopados com quatro elementos: cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), e níquel (Ni) em diferentes concentrações e em duas formas distintas de controle. Os isolados bacterianos UFU A18 e UFU B13 foram mais agressivos nos genótipos de milho suscetíveis (DKB230, AGV9025) e no genótipo resistente (2B810PW) não houve desenvolvimento da doença. Os isolados foram identificados como *P. ananatis* com o uso do primer específico e permitiu o estudo da diversidade genética dos isolados com o primer BOX. A utilização de nanocristais de óxido de zinco (ZnO) dopados com cobre e manganês reduziu a severidade da doença em plantas de milho em casa de vegetação.

Palavras-chave: Mancha branca; Nanopartículas; PCR; *Zea mays*.

ABSTRACT

The maize white spot, caused by *Pantoea ananatis* stands out as one of the main foliar diseases of culture. For the management of this disease it is recommended the use of resistant genotypes and chemicals that there has been presenting efficiency, therefore a technological innovation in chemical control of phytopathogens should be evaluated in the control of the disease. Thus, the present work had as objectives: to assess the aggressiveness of isolates of *P. ananatis*; molecularly characterize isolates of *P. ananatis* and to evaluate the effect of nanoparticles in control of bacteria in corn plants. For the evaluation of aggressiveness were used nine isolates of *P. ananatis* inoculated in three maize genotypes (DKB230, AG9025, 2B810PW), with four replications. The severity of white spot of leaves was evaluated at 2, 4, 6 and 8 days after inoculation, using a scale of note; for molecular characterization were studied 23 isolates of *P. ananatis* using the specific primers ANAF/ANAR and universal BOX. To control with nanoparticles were used nanocrystals of (ZnO) doped with four elements - copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn), and nickel (Ni) - in different concentrations and in two distinct forms of control. The bacterial isolates UFU18 and UFU B13 were more aggressive in maize genotypes susceptible (DKB230, AGV9025), and in the resistant genotype (2B810PW) there was no disease development of the disease. The isolates were identified as *P. ananatis* using specific primer and allowed the study of genetic diversity of the isolates with primer BOX. The use of nanocrystals of zinc oxide (ZnO) doped with copper (Cu) and manganese (Mn) reduced disease severity in maize plants in greenhouse.

Keywords: Maize white spot; Nanoparticles; PCR; *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. AGRESSIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Pantoea ananatis* EM MILHO

FIGURA 1. Dendograma de 23 isolados de *Pantoea ananatis* de acordo com o índice de similaridade obtido pelo primer BOX.....41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. AGRESSIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Pantoea ananatis* EM MILHO

TABELA 1. Isolados de *Pantoea ananatis* provenientes da coleção do Laboratório de Bacteriologia vegetal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Uberlândia – MG33

TABELA 2. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha branca do milho, de diferentes isolados *Pantoea ananatis* e diferentes genótipos de milho. Uberlândia – MG.....37

CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE *Pantoea ananatis* IN VIVO

TABELA 1. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha branca do milho, no controle preventivo e curativo da doença, com diferentes nanocristais e concentrações. Uberlândia – MG.....49

TABELA 2. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha branca, com diferentes nanocristais, em plantas de milho. Uberlândia – MG.....50

TABELA 3. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha branca, com diferentes nanocristais, em plantas de milho. Uberlândia – MG.....52

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Importância do milho	15
2.2 Mancha branca do milho	15
2.2.1 Agente etiológico.....	15
2.2.2 Aspectos gerais da doença.....	16
2.3 Caracterização molecular da <i>Pantoea ananatis</i>	18
2.4 Diversidade genética de <i>Pantoea ananatis</i>	19
2.5 Nanopartículas.....	20
2.5.1 Controle microbiano com nanopartícula	21
REFERENCIAS.....	23
CAPÍTULO 1. AGRESSIVIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Pantoea ananatis</i>	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Obtenção dos isolados de <i>Pantoea ananatis</i> e padronização do inóculo.....	32
2.1.1 Avaliação da agressividade de isolados de <i>Pantoea ananatis</i> em genótipos de milho.....	33
2.2 Caracterização molecular de isolados de <i>Pantoea ananatis</i> pela reação em cadeia polimerase.....	33
2.2.1 Extração do DNA	33
2.2.2 Quantificação do DNA	34
2.2.3 Identificação de <i>Pantoea ananatis</i> por primers específicos	34
2.2.4 Diversidade genética de <i>Pantoea ananatis</i> pelo primer BOX.....	34
2.2.5 Dendrograma	34

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.1 Avaliação da agressividade de isolados de <i>Pantoea ananatis</i>	36
3.2 Diversidade genética de isolados de <i>Pantoea ananatis</i>	37
4. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE <i>Pantoea ananatis</i> NA CULTURA DO MILHO	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Ensaio 1	46
2.1.1 Obtenção do isolado de <i>Pantoea ananatis</i> e padronização do inóculo	46
2.1.2 Obtenção dos nanocristais de ZnO	46
2.1.3 Condução e avaliação	46
2.2 Ensaio 2	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem grande importância no cenário da agricultura brasileira, sendo a segunda espécie vegetal mais cultivada, após a soja (MÔRO e FRITSCH NETO, 2015). Para a safra 2018/19 o país deve alcançar produção total de 96,0 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

Apesar do aumento na produtividade, modificações importantes ocorreram na dinâmica populacional dos patógenos resultando no aparecimento de novos problemas fitossanitários. A importância de cada doença varia de ano para ano e de região para região, porém algumas das doenças são de ocorrência mais generalizada nas principais regiões de plantio, como a Mancha branca do milho (MBM) (PAES, 2006) causada pela bactéria *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). A MBM em elevada severidade pode contribuir para a redução dos índices de produtividade da cultura. Em genótipos suscetíveis a MBM tem como sintomas iniciais a formação de lesões reduzindo o ciclo da cultura devido à redução da área fotossintética, visto que 10-20% de severidade representa 40% menos de fotossíntese líquida, o que equivale a 60% de perdas na produção final da cultura (PINTO, 1997; GODOY et al., 2001).

Estudos sobre a diversidade genética de *P. ananatis* utilizando a técnica de rep-PCR, com isolados obtidos de plantas de milho, sorgo e capim-colchão mostrou existir aparentemente alta variabilidade genética entre os isolados dos diferentes hospedeiros (LANA et al., 2012). O estudo da diversidade genética permite agrupar isolados por características semelhantes entre si como o local de origem, grau de agressividade, material de coleta, entre outros.

Quanto às estratégias de controle, a utilização de genótipos resistentes constitui uma fonte segura e sem riscos ambientais. Entretanto, ainda não se tem disponíveis uma ampla gama de genótipos com resistência a determinada doença. Diante disso, o uso de bactericidas/fungicidas vem sendo utilizado com frequência, porém, o mesmo não é eficiente e inovações tecnológicas de controle devem ser avaliados para o controle da bactéria como o uso de nanopartículas.

As nanopartículas, são partículas em escala nanométrica, que podem ser sintetizadas por métodos físicos, químicos e biológicos e apresentam elevada eficácia biocida. Nesse sentido, o tamanho nanométrico resulta em alta relação superfície/volume que gera interações íntimas com as membranas microbianas (ALLAKER, 2010; MORONES et al., 2005). As

nanopartículas podem ser amorfas (estrutura desorganizada) e cristalinas (estrutura cristalina). Esta por apresentar baixa genotoxicidade foi utilizada no presente trabalho.

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) têm sido utilizadas na indústria têxtil e farmacológica, devido a suas propriedades de relação superfície/volume, reduzida toxidez, biocompatibilidade, reduzido custo e de fácil síntese (KWON et al., 2014; SHI et al., 2014; SINGH e NANDA, 2014; WILLANDER et al., 2014). Uma forma de ajustar as propriedades dos óxidos de zinco é alterar sua estrutura física e eletrônica por meio da dopagem, permitindo a incorporação de novos elementos na estrutura cristalina, alterando o posicionamento das bandas de condução e valência modificando os mecanismos de difusão, crescimento de grão e síntese, modificando características químicas como acidez da superfície e criando sítios de adsorção (CALLISTER JÚNIOR, 2002).

Diante disso, o objetivo do trabalho é avaliar a agressividade e caracterização molecular de isolados de *Pantoea ananatis* e controle da bactéria com uso de nanopartículas de ZnO em plantas do milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância do milho

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho sendo superado apenas pelos Estados Unidos e China. Com produção estimada de 96,00 milhões de toneladas de grãos na safra 2018/2019 (CONAB, 2018).

A produtividade do milho pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles: manejo da lavoura, potencial genético do material escolhido, condições ambientais e outros. Entretanto, a ocorrência de doenças nas principais regiões produtoras do país tem-se tornado grande preocupação, visto o alto percentual de perdas ao longo dos anos causados pelas doenças. A expansão da fronteira agrícola, adoção do sistema de plantio direto, ausência da rotação de culturas, utilização de genótipos susceptíveis, entre outros fatores favoreceu modificações importantes na dinâmica populacional de patógenos, resultando no aparecimento de novos problemas fitossanitários (EMBRAPA, 2009).

A ocorrência de cada doença pode variar de acordo com a época e região. Entretanto, a MBM é considerada atualmente, como uma das principais doenças foliares do milho, tanto pelos altos índices de perdas e prejuízos no campo, como também pela sua ampla distribuição em diferentes regiões produtoras no Brasil (PINTO, 1999). A alta incidência da MBM pode reduzir a área fotossinteticamente ativa e causar perdas de até 60% na produção final. Os sintomas iniciais surgem nos primeiros estádios de desenvolvimento da cultura, tornando-se mais severos no final do ciclo do milho (COSTA et al., 2009).

2.2 Mancha branca do milho

2.2.1 Agente etiológico

A mancha branca do milho (MBM), conhecida como pinta branca, causada pela bactéria *Pantoea ananatis*, é considerada uma das mais importantes enfermidades foliares dessa cultura estando amplamente distribuída no país (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; PACCOLA-MEIRELLES et al., 2008; BOMFETI et al., 2008). Paccola-Meirelles et al. (2001) isolou e identificou a bactéria *Pantoea ananatis* (sin. *Erwinia ananas*) a partir de lesões de estágio inicial da mancha foliar de *Phaeosphaeria*, em uma incidência de 86% e 77%. Esta bactéria quando inoculada em plantas de milho reproduziu em casa de vegetação sintomas semelhantes aos da doença no campo. A bactéria foi reisolada a partir das lesões

concluindo assim os postulados de Koch, confirmando ser a bactéria (*Pantoea ananatis*) o agente causal da doença, e não um fungo *Phaeosphaeria maydis* como postulado inicialmente, sendo o fungo um oportunista. Também ao avaliar o desempenho de diversos genótipos de milho previamente selecionados entre suscetíveis e resistentes, quando inoculados com a bactéria, as reações foram análogas à analisada em condições de campo (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2002).

Em trabalhos posteriores Bomfeti et al. (2008) com técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão observaram grande número de células bacterianas ocupando os espaços intercelulares das lesões da mancha branca do milho, não sendo observado estruturas fúngicas nas lesões mais jovens. Bomfeti et al. (2008), utilizou a técnica de PCR para identificar tanto a bactéria quanto o fungo em diferentes estádios da cultura de lesões da MBM. No estágio de anasarca, observou-se amplificação de DNA somente com *primers* bacterianos. A amplificação do DNA do fungo ocorreu somente em lesões de estádios mais avançados no qual o tecido já se encontrava necrosado. Com esses resultados os autores reforçaram a hipótese de que as lesões de MBM são causadas por bactérias e que fungos oportunistas podem colonizá-las posteriormente.

Segundo Paccola-Meirelles et al. (2001), a bactéria *P. ananatis* é gram-negativa, não esporulante, anaeróbia facultativa, formadora de colônias com crescimento mucoso e de coloração amarelo brilhante. Quando em meio de cultura a frequência de isolamento é maior nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta, diminuindo significativamente nos estágios mais avançados.

A bactéria sobrevive epifiticamente na área foliar do milho, podendo progredir de tamanho mesmo na ausência da manifestação da doença sobre as folhas. A bactéria possui um mecanismo chamado quórum-sensing (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2008) que possibilita comunicação através de uma substância química sinalizadora denominada acil-homoserine lactona (MOROHOSHI et al., 2007). Esta substância produz um exopolissacarídeo que protege a célula bacteriana de mecanismos de defesa do hospedeiro e obstrui a circulação da seiva nas folhas que originam o tecido necrosado. Em relação à patogenicidade, o patógeno produz cristais de gelo em temperaturas onde não poderiam ser formados, fenômeno conhecido com nucleação do gelo, que as plantas não toleram o congelamento do meio intercelular fazendo com que as lesões sejam exteriorizadas (GONÇALVES et al., 2015).

2.2.2 Aspectos gerais da doença

A doença MBM atualmente encontra-se distribuída em toda extensão do território brasileiro, sendo identificada causando infecções tanto em plantas monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas (COUTINHO e VENTER, 2009) como na cultura do melão, cebola, aveia e tomate (GITAITIS et al., 1997; AZAD et al., 2000; COTHER et al., 2004). Na cultura do milho foi relatada pela primeira vez na África do Sul por Goszczynska et al. (2007), no México por Pérez-y-Terrón et al. (2009) e na Argentina por Alippi e López (2010).

A MBM tem ocorrência favorecida em condições de temperatura moderada, em torno de 14 °C e alta umidade do ar associada a frequentes períodos de chuva (SAWAZAKI et al., 1997). Além do manejo da adubação, da época de semeadura e do plantio direto, o potencial de inóculo pode elevar significativamente possibilitando maior severidade da doença (FERNANDES e OLIVEIRA, 2000). Segundo Fernandes e Oliveira (2000) os sintomas iniciam-se nas folhas inferiores das plantas de milho evoluindo rapidamente em direção do ápice, sendo mais severos após o estágio de pendramento. De acordo com Paccola-Meirelles et al. (2001) as lesões da doença apresentam cor verde escuro com aspecto de encharcamento, e posteriormente se tornam necróticas de coloração palha podendo coalescer.

A produção intensa da cultura do milho exige que sejam feitas semeaduras antecipadas sob irrigação (PEREIRA et al., 2005). Como consequência, houve uma modificação na dinâmica populacional dos patógenos que prejudicam a cultura promovendo um incremento na incidência e na severidade de doenças nas regiões produtoras (LANZA, 2009). Segundo Fernandes e Oliveira (2000), o inóculo primário da bactéria pode ter origem nos restos culturais do milho, o que dificulta o seu controle, pois ao realizar a semeadura direta o potencial do inóculo poderá aumentar sujeitando as lavouras de milho à ocorrência da doença.

Dentre as estratégias de controle, a utilização de genótipos resistentes constitui uma fonte segura e sem riscos ambientais. Entretanto, não se tem ainda disponíveis uma ampla gama de genótipos com resistência a MBM. Podendo complementar com outras medidas de controle, como a utilização de cultivares menos susceptíveis; plantio na época mais adequada, visando menor ocorrência da doença; sementes tratadas; rotação de cultura; manejo adequado da adubação da lavoura; eliminação de restos culturais e controle químico (EMBRAPA, 2009). Híbridos suscetíveis à MBM podem chegar a apresentar perdas em torno de 60% da produção, que podem ser evitadas quando da utilização de híbridos resistentes, sendo este, o método mais eficiente, racional e econômico para evitar ou diminuir os danos causados por esta doença (BRITO et al., 2011).

Sendo assim, o estudo da agressividade de isolados bacterianos é importante na seleção de híbridos resistentes.

2.3 Caracterização molecular da *Pantoea ananatis*

A identificação de espécies do gênero *Pantoea* normalmente é realizada por meio de análise de diferentes caracteres fenotípicos e testes bioquímicos não conclusivos. Estes métodos além de demandar muito tempo, requerem profissionais com conhecimento especializado, visto que a identificação dos isolados ao nível de espécies é difícil (BRADY, 2005).

As técnicas moleculares para detecção de diversos patógenos são ferramentas bastante promissoras, devido à sua alta precisão em caracterizar organismos e apresentar resultados rápidos na identificação (LOUWS, 1994). E dentre essas destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR, Polymerase Chain Reaction).

A técnica de PCR permite a replicação *in vitro* do DNA de maneira muito rápida, no qual em poucas horas, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificados em milhões de vezes tornando possível a rápida identificação de espécies, de marcadores genéticos e de patógenos (SEBASTIÃO, 2015). A região em interesse do DNA para ser amplificado é determinada por pequenas sequências de DNA, denominadas primers ou iniciadores, os quais são construídas artificialmente, complementares e específicas a duas regiões distintas no DNA do patógeno. Os *primers* variam desde universais a grupo-específicos (BEJ, 2004).

Para a espécie *P. ananatis*, trabalho realizado por Figueiredo e Paccola-Meirelles (2012) demonstraram que reações de PCR com os iniciadores específicos representam uma estratégia confiável e de rápida identificação de isolados de *Pantoea ananatis* provenientes de plantas de milho, sorgo e *Digitaria* sp. Em estudo realizado por Miller (2014) os *primers* específicos para *P. ananatis* ANAF/ANAR, também confirmaram a identidade dos isolados bacterianos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Mamede (2018) utilizando os mesmos *primers* para isolados de *P. ananatis*. Gonçalves (2012) afirmam que os *primers* ANAF/ANAR mostraram-se eficientes para identificação dos isolados e dos reisolados obtidos em todos os testes de patogenicidade, proporcionando uma única cópia em todo o genoma da *P. ananatis*, com tamanhos variando de 360 a 380 pb. O autor ainda cita que o par de *primers* apresentou excelente anelamento com temperatura de 58°C, no qual

possibilitou a obtenção de uma única banda de DNA amplificado sendo muito específica e nítida para cada isolado de *P. ananatis*.

Segundo Miller (2014) entre os marcadores mais utilizados para estudos de populações, é o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polismorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados), no qual se destaca pela alta detecção de variabilidade genética. Vos et al. (1995) afirmaram que é uma estratégia que representa alta eficiência pela possibilidade de analisar um grande número de polimorfismos simultaneamente, com ampla cobertura do genoma, no qual o perfil de bandas geradas é em razão da variação nos sítios de restrição das enzimas utilizadas.

2.4 Diversidade genética de *Pantoea ananatis*

Para o manejo da MBM a medida mais eficiente e econômica da doença é a utilização de variedades resistentes, principalmente em locais que apresentem condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença (PEREIRA et al., 2005). Porém de acordo com Miller (2014) o desenvolvimento e sucesso dos programas de melhoramento de plantas com resistências às doenças, dependem do conhecimento da diversidade genética do patógeno, principalmente para a estabilidade e durabilidade desta resistência em campo.

A diversidade genética se refere a toda variação biológica hereditária acumulada durante o processo evolutivo, no qual é gerada fundamentalmente, por mutação na sequência nucleotídica durante a replicação do DNA, e sendo responsável por parte das diferenciações fenotípicas (SANTOS et al., 2009). Esta variação genética expressada geralmente pode ser reconhecida por diferenças em moléculas de proteínas, diversas características fisiológicas, bioquímicas e também por variações comportamentais e morfológicas (SANTOS et al., 2009).

De acordo com Miller et al. (2016) estudos sobre a variabilidade genética de *P. ananatis* em milho são bastante escassos. Lana et al. (2012) utilizando a técnica de rep-PCR relataram uma alta variabilidade genética entre isolados de *Pantoea* coletadas de folhas de milho, sorgo e capim-colchão. Miller et al. (2016) em estudo com 90 isolados de *P. ananatis* em três regiões diferentes, relataram a porcentagem de polimorfismo de 24,64 a 92,46 e a diversidade gênica desde 0,07-0,09.

A falta de conhecimento da diversidade genética de *P. ananatis* têm sido um desafio para o desenvolvimento de genótipos resistentes à doença, resultando assim em cultivares com resistência de curto prazo e ineficientes (MILLER et al., 2016). Segundo Souza e Duarte (2002) a resistência genética de *P. ananatis* é instável, pois os níveis de resistência de um

híbrido de milho podem variar em diferentes ambientes. Segundo Hanage et al. (2006) é importante o conhecimento dos processos evolutivos, adaptações patogênicas e a diversidade genética das populações bacterianas, visando as estratégias de manejo da doença em programas de melhoramento genético.

2.5 Nanopartículas

A nanotecnologia é baseada na criação de partículas em escala nanométrica, denominadas nanopartículas. As nanopartículas vêm sendo utilizadas para várias finalidades como na detecção de materiais tóxicos na atmosfera através de nanosensores (SALAMANCA-BUENTELLO et al., 2005), no tratamento de água e efluentes (PAN e XING, 2008) e na detecção de patógenos nos alimentos (SOZER e KOKINI, 2009).

As nanopartículas, embora com a mesma composição, comportam-se distintamente quanto à coloração, condutividade elétrica e propriedades termodinâmicas a depender do tamanho das partículas, isso devido as interações das forças entre as moléculas do material fazendo variar, portanto, seu impacto sobre o meio ambiente, saúde humana e a sociedade como um todo (RIBOLDI, 2009).

As nanopartículas são sintetizadas por métodos químicos, físicos ou biológicos (RAI, 2003). Nos métodos químicos as nanopartículas são formadas por meio de reações químicas entre íons ou moléculas. Nos métodos físicos os materiais sofrem moagem, têmpera, decomposição química, irradiação entre outros, sendo o nanomaterial formado a partir de uma amostra maior (HABIBA et al., 2014). O uso do método biológico é realizado com utilização de bactérias, fungos. Sendo denominado biossíntese (RAI, 2003). Porém, o rendimento não é grande quando comparado ao método químico.

A utilização de defensivos agrícolas em larga escala e muitas vezes de forma indiscriminada, além de ocasionar riscos de toxicidade para organismos não alvos e poluição ambiental, podem levar a resistência de pragas e doenças tornando o método de controle ineficiente. Diante disso, atualmente, tem se buscado alternativas viáveis como o desenvolvimento de produtos biológicos, biodegradáveis e mais seguros para o homem e o meio ambiente (GONZALEZ et al, 2014).

A utilização de nanopartículas na agricultura representa uma importante inovação tecnológica, no qual proporcionará aumento na produtividade das culturas e qualidade dos produtos. Elas podem ser utilizadas na produção de nanofertilizantes, nanocidas ou pesticidas encapsulados em nanopartículas para liberação controlada (FURLANETO, 2011). De acordo

com Araújo (2014) ainda são bastante escassos os estudos com o uso da nanotecnologia visando o controle *in vitro* de fitopatógenos. Porém, resultados satisfatórios atestando à utilização de nanopartículas no controle de diferentes fungos fitopatogênicos já foram relatados na literatura (KIM et al., 2009; KIM et al., 2012). As nanopartículas podem ser amorfas (estrutura desorganizada) e cristalinas (estrutura cristalina). Esta por apresentar baixa genotoxicidade é mais utilizada.

2.5.1 Controle microbiano com nanopartícula

As nanopartículas utilizadas como agentes antimicrobianos vêm ganhando destaque, visto que possuem tamanho nanométrico, proporcionando assim interação com as membranas microbianas resultando em elevada eficácia biocida (ALLAKER, 2010; MORONES et al., 2005). Segundo Kah e Hofmann (2014) basicamente o desenvolvimento de formulações com nanopartículas favorecem o aumento da solubilidade dos compostos ativos, liberação de forma lenta e/ou proteção contra a degradação prematura do ativo encapsulado.

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) apresentam propriedades bactericidas, capazes de inibir os microrganismos (SAWAI, et al., 1996), devido aumento do nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs), ocasionando o vazamento da membrana plasmática danos celulares e morte (WANG et al., 2014).

Vários fatores influenciam na atividade das nanopartículas de ZnO, como formato, tamanho e concentração. A forma esférica tem a penetração mais dificultada nas paredes celulares bacterianas, quando comparadas com formato de bastão ou fio (YANG et al., 2009). Em relação ao tamanho, quanto menor, maior a sua capacidade de penetração (ZHANG et al., 2007; YAMAMOTO, 2001) e quanto maior a sua concentração, maior a atividade microbiana (YAMAMOTO, 2001).

Os nanocristais (NCs) pode ser ajustado através da alteração da sua estrutura física e eletrônica, através da dopagem. A dopagem permite integrar novos elementos na estrutura da nanopartícula modificando assim suas características químicas (CALLISTER JÚNIOR, 2002). Os nanocristais de ZnO dopados apresentam alta estabilidade diferentemente dos produtos tradicionais utilizados. A incorporação pode ser feita com íons metálicos como: cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), cobalto (Co), cromo (Cr), molibdênio (Mo), nióbio (Nb), vanádio (V), rutênio (Ru), prata (Ag), platina (Pt) e ouro (Au) na estrutura do material, que reduz a faixa de energia em um sólido, onde nenhum estado de elétrons pode existir. Com base no mecanismo de fototividade dos semicondutores a dopagem destes

favorece a fotoativação pela luz visível devido ao surgimento de novos níveis de energia produzidos entre a banda proibida “band gap” do material (ZALESKA, 2008).

Kim et al. (2009) avaliando nanopartículas de prata para o controle *in vitro* de *Raffaella* sp., verificaram que o crescimento do fungo foi inibido, sendo que quanto maior a dose utilizada, menor crescimento de hifas de fungos, e menor germinação dos conídios. Já em trabalho realizado por Kim et al. (2012) avaliando o efeito antifúngico de três diferentes nanopartículas de prata, em diferentes concentrações no controle *in vitro* de dezoito espécies de fitopatogênicos, observaram a inibição total do crescimento da maioria dos patógenos na maior concentração (100 ppm). Araújo (2014) observou redução no crescimento micelial de *Fusarium pallidorozeum*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani* com a aplicação de nanopartículas de prata.

Em trabalho conduzido por Mamede (2018) foi observado que nanocristal de ZnO não apresentou efeito bactericida para *Pantoea ananatis*, porém quando utilizado nanocristais de ZnO dopados com Cu, Mn, Ni, Au e Ag que apresentam tamanho de 20nm e forma de bastão foi observado inibição do crescimento bacteriano *in vitro*.

Segundo Dastjerdi e Montazer (2010) para o controle de microrganismos, nanopartículas mais estudadas são as de prata e ouro, sendo estes, capazes de agir em mais de 500 microrganismos patogênicos (bactérias, vírus e fungos). Os autores ainda citam que existem poucos relatos indicando a resistência bacteriana, sendo eficazes tanto em bactérias Gram negativas, quanto Gram positivas, e, além disso, apresentam baixa toxicidade para células animais.

Como uma alternativa no controle de fitopatógenos a utilização de nanopartículas representa uma inovação tecnológica na agricultura com grande potencial, porém há necessidade de mais estudos para o conhecimento dos seus mecanismos de toxicidade nos níveis celular e molecular, melhores dopagens e concentrações para obtenção de alta eficiência sobre o alvo.

REFERENCIAS

ALIPPI, A. M.; LÓPEZ, A. C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 60, n. 4, p. 487-487, 2010.

<https://doi.org/10.1094/PDIS-94-4-0487A>

ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of Dental Research**, Amsterdam, v. 89, n. 11, p. 1175-1186, 2010.

<https://doi.org/10.1177/0022034510377794>

ARAÚJO, J. A. M. **Nanopartículas, óleos essenciais e extratos vegetais no controle in vitro de fungos fitopatogênicos**. 108 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia).

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2014.

AZAD, H. R.; HOLMES, G. J.; COOKSEY, D. A. A new leafblotch disease of sudangrass caused by *Pantoea anananas* e *Pantoea stewartii*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 9, p. 973-979, 2000.

<https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.973>

BEJ, A. K. **Detection of microbial nucleic acids by polymerase chain reaction in aquatic samples**. 2nd ed. In: Molecular Ecology Manual, [S.I.; s.n], 2004. p. 369-432.

BOMFETI, C.A.; SOUZA-PACOLLA, E.A.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; MARRIEL, I.E.; MEIRELLES, W.F.; CASELA, C.R. & PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 1-6, 2008.

BRADY, C. L. **Taxonomy and relatedness of Pantoea strains recovered from Eucalyptus from South Africa, South America and Uganda**. 100 f. 2005. Tese (Doutorado) - University of Pretoria, Pretoria, Gauteng, 2005.

BRITO, A. H.; PINHO, R. G.; SANTOS, A. O.; SANTOS, S. Reação de híbridos de milho e comparação de métodos para avaliação da Cercosporiose e Mancha Branca. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 36, n.1, p.291-301, 2011.

CALLISTER JÚNIOR, W. D. **Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma introdução**. 9th ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 912 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos, v. 6 – Safra 2018/19 – Segundo levantamento, Nov. 2018.

Disponível em: < <http://www.conab.gov.br> >. Acesso em 22 Dez. 2018.

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Doenças. In CRUZ, J. C. (Ed). **Cultivo do milho**. 5 ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.

COTHER, E. J.; REINKE, R.; MCKENZIE, C.; LANOISELET, V.M.; NOBLE, D. H. An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananatis* and the first record of this pathogen on rice in Australia. **Australian Plant Pathology**, Clayton, v. 33, n.4, p. 495-503, 2004.

<https://doi.org/10.1071/AP04053>

COUTINHO, T.; VENTER, S. N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 325–335, 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00542.x>

DASTJERDI, R.; MONTAZER, M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. **Colloids and surfaces B, Biointerfaces**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 5-18, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.029>

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistemas de produção**. 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicações/milho_5_ed/doencas.htm>. Acesso em: 27 dez. 2017.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais Doenças na Cultura do Milho**. Sete lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2000, 80 p.

FIGUEIREDO, J. E. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Simple, rapid and accurate PCR-based detection of *Pantoea ananatis* in maize, sorghum and *Digitaria* sp. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 94, n. 3, p. 663-667, 2012.

FURLANETO, F. P. B. Nanotecnologia no setor agropecuário. **Pesquisa & Tecnologia**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 1-4, 2011.

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**, Saint Paul, v. 81, n. 9, p. 1096-1096, 1997. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.9.1096C>

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infectadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 209-215. 2001.

GONÇALVES, R. M. **Estudos etiológicos da mancha branca do milho e identificação de hospedeiros alternativos de *Pantoea ananatis***. 86 f. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

GONÇALVES, R. M.; MEIRELLES, W. F.; FIGUEIREDO, J. E. F.; BALBI- PENÃ, M. I.; PACCOLA MEIRELLES, L.D. *Digitaria horizontalis* and *D. insularis* as alternative hosts for *Pantoea ananatis* in brazilian maize fields. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 97, n. 1, p. 177-181, 2015.

GONZALEZ, M. S.; LIMA, B. G.; OLIVEIRA, A. F. R.; NUNES, D. D.; FERNANDES, C. P.; SANTOS, M. G.; TIETBOHL, L. A. C.; MELLO, C. B.; ROCHA, L.; FEDER, D. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 413–418, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.05.003>

GOSZCZYNSKA, T., BOTHA, W. J., VENTER, S. N., AND COUTINHO, T. A. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South

Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 6, p. 711-718, 2007. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0711>

HABIBA, K.; MAKAROV, V. I.; WEINER, B. R.; MORELL, G. Fabrication of Nanomaterials by Pulsed Laser Synthesis. In: WAQAR, A; ALIN, N. **Manufacturing Nanostructures**. [S.I: s.n]. 2014. p. 263-292.

HANAGE, W. P.; FRASER, C.; SPRATT, B. G. The impact of homologous recombination on the generation of diversity in bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 239, n. 2, p. 210-219, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.08.035>

KAH, M., HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, [S.I.], v. 63, p. 224–235, 2014.

KIM, S. W.; JUNG, J. H.; LAMSAL, K.; KIM, Y. S.; MIN, J. S.; LEE, Y. S. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. **Mycobiology**, [S.I.], v. 40, n. 1, p. 53-58, 2012.

KIM, S. W.; KIM, K. S.; LAMSAL, K.; KIM, Y. J.; KIM, S. B.; JUNG, M.; SIM, S. J.; KIM, H. S.; CHANG, S. J.; KIM, J. K.; LEE, Y. S. An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 19, n. 8, p. 760-764, 2009.

KWON, J. Y.; LEE, S. Y.; KOEDRITH, P.; LEE, J. Y.; KIM, K. M.; OH, J. M.; YANG, S. I.; KIM, M. K.; LEE, J. K.; JEONG, J.; MAENG, E. H.; LEE, B. J.; SEO, Y. R. Lack of genotoxic potential of ZnO nanoparticles in in vitro and in vivo tests. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 761, p. 1-9, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.01.005>

LANA, U. G. P.; GOMES, E. A.; SILVA, D. D.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; SOUZA, I. R. P.; GUIMARÃES, C. T. Detection and molecular diversity of *Pantoea ananatis* associated with white spot disease in maize, sorghum and crabgrass in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, p. 441-448, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01924.x>

LANZA, Fabrício Eustáquio. **MANCHA BRANCA DO MILHO (*Pantoea ananatis*): VARIABILIDADE NO PATÓGENO E RESISTÊNCIA GENÉTICA NO HOSPEDEIRO**. 2009. 16 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; BRUJIN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas pathovars* and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, 1994.

MAMEDE, M. C.; TEBALDI, N. D; MOTA, L. C. B. M.; MARTINS, O. M.; COELHO, L. Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 43, p. 254-256, 2018.

MILLER, A. M. **Variabilidade genética e nucleação de gelo em isolados de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho**. 73 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

MILLER, A. M.; FIGUEIREDO, J. E. F.; CHAVES, C. L.; RUAS, E. A.; BALBI-PEÑA, M. I.; COLAUTO, N. B.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Genomic variability of *Pantoea ananatis* in maize White spot lesions assessed by AFLP markers. **Genetics and Molecular**, [S.I.], v. 15, n. 4, 2016.

MÔRO, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. Importância e usos do milho no Brasil. In: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; 84 MUNDSTOCK, C. M.; SILVA, P. R. **Manejo da cultura do milho para alto rendimento de grãos**. Porto Alegre: Evangraf. 2015. 51 p.

MOROHOSHI, T.; NAKAMURA, Y.; YAMAZAKI, G.; ISHIDA, A.; KATO, N.; IKEDA, T. The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces N-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 22, p. 8333-8338, 2007. <https://doi.org/10.1128/JB.01054-07>

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Mancha Branca x *Pantoea ananatis*. In: Congresso nacional de milho e sorgo: Workshop sobre manejo e etiologia da mancha branca do milho, 27, 2008, Londrina. **Anais...** Londrina, 2008. CD ROM.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; FERREIRA, A. S.; MEIRELLES, W. F.; MARRIEL, I. E.; CASELA, C. R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 275-279, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MEIRELLES, W. F.; PARENTONI, S. N.; MARRIEL, I. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Reaction of maize inbred lines to the bacterium *Pantoea ananatis* from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.2, n. 4, p. 578-590, 2002. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v02n04a12>

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006, 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 75).

PAN, B.; XING, B. S. Adsorption Mechanisms of Organic Chemicals on Carbon Nanotubes. **Environmental Science & Technology**, London, v. 42, n. 24, p. 9005-9013, 2008.

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

PÉREZ-Y-TÉRRON, R.; VILLEGAS, M. C.; CUELLAR, A.; MUÑOZ-ROJAS, J.; CASTAÑEDALUCIO, M.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; BUSTILLOS- CRISTALES, R.;

BAUTISTA-SOSA, L.; MUNIVE, J. A.; CAICEDO-RIVAS, R.; FUENTES-RAMIREZ, L. E. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agente of leaf spot disease of maize, in Mexico. **Australin Plant Disease Notes**, Saint Paul, v.4, n. 1, p. 96-99, 2009.

PINTO, K. F. J. A. Eficiência de doses e intervalos de aplicações de fungicidas no controle da mancha foliar do milho provocada por *Phaeosphaeria maydis* Rane, Payak e Renfro. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 23, p. 1769-1778, 1999.

PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Milho (*Zea mays* L.): Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: Grandes Culturas**. Viçosa: UFV, 1997, p. 821 - 863.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 65, n. 3, p. 44-48, 2003.
<https://doi.org/10.21800/S0009-67252013000300014>

RIBOLDI, B. M. **Nanotecnologia: Fundamentos e Aplicações**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Departamento de Física – Instituto de Geociências e Ciências Exatas Campus de Rio Claro, 2009.

SALAMANCA-BUENTELLO, F.; PERSAD, D. L.; COURT, E. B.; MARTIN, D. K.; DAAR, A. S.; SINGER, P. A. Nanotechnonology and the developing world. **PloS Medicine**, San Francisco, v. 2, n. 5, p. 383-386, 2005.

SANTOS, F. R.; LACERDA, D. R.; REDONDO, R. A. F.; NASCIMENTO, A. M. A.; CHARTONE-SOUZA, E.; BORBA, E. L.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Diversidade genética. In: DRUMMOND, G. M.; MARTINS, C. S.; GRECO, M. B.; VIEIRA, F. (Eds). **Diagnostico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2009. p. 389-410.

SAWAI, J.; KAWADA, E.; KANOU, F.; IGARASHI, H.; HASHIMOTO, A.; KOKUGAN, T.; SHIMIZU, M. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. **Journal of chemical engineering of Japan**, Tokyo, v. 29, n. 4, p. 627-633, 1996.

SAWAZAKI, E.; DUDIENAS, C.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; GALVÃO, J. C. C.; CASTRO, J. L.; PEREIRA, J. Reação de cultivares de milho à mancha de *Phaeosphaeria* no estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n. 6, p. 585-589, 1997.

SEBASTIÃO, F. A. **Validação de técnicas moleculares para o diagnóstico de bactérias em peixes, visando redução de tempo e custo**. 136 f. 2015. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jabotical, 2015.

SHI, H.; LIU, X.; ZHANG, Y. Fabrication of novel antimicrobial poly (vinyl chloride) plastic for automobile interior applications. **Iranian Polymer Journal**, [S.I.], v. 23, n. 4, p. 297-305, 2014.

SINGH, P.; NANDA, A. Enhanced sun protection of nano-sized metal oxide particles over conventional metal oxide particles: an in vitro comparative study. **International Journal of Cosmetic Science**, London, v. 36, n. 3, p. 273-283, 2014. <https://doi.org/10.1111/ics.12124>

SOUZA, J.C.; DUARTE, J.M. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis*. **Ciência e Agrotecnologia**, Larvas, n. 26, n. 2, p. 325-331, 2002.

SOZER, N. KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010>

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>

WANG, B.; ZHANG, Y.; MAO, Z.; YU, D.; GAO, C. Toxicity of ZnO nanoparticles to macrophages due to cell uptake and intracellular release of zinc ions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 14, n. 8, p. 5688-5696, 2014.

WILLANDER, M.; KHUN, K.; IBUPOTO, Z. H. ZnO based potentiometric and amperometric nanosensors. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 14, n. 9, p. 6497-6508, 2014.

YAMAMOTO, O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. **Internacional Journal of Inorganic Materials**, [S.1], v.3, n. 7, p. 643-646, 2001.

YANG, H.; LIU, C.; YANG, D.; ZHANG, H.; XI, Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 29, n. 1, p. 69-78, 2009. <https://doi.org/10.1002/jat.1385>

ZALESKA, A. Doped-TiO₂: A Review. **Recent Patents on Engineering**, Adelaide, v.2, n. 3, p. 157-164, 2008. <https://doi.org/10.2174/187221208786306289>

ZHANG, L.L.; JIANG, Y.H.; DING, Y.L.; POVEY, M.; YORK, D. Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 9, n. 3, p. 479-489, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11051-006-9150-1>

CAPÍTULO 1. AGRESSIVIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE

Pantoea ananatis

RESUMO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem grande importância na agricultura brasileira devido à extensa área cultivada. A mancha branca do milho, causada pela bactéria *Pantoea ananatis* tem ocorrência endêmica em algumas regiões e para o controle da doença recomenda-se a utilização de genótipos resistentes. No entanto, para a obtenção de genótipos resistentes deve-se avaliar a agressividade dos isolados a serem utilizados e também conhecer a sua diversidade genética. Portanto, este trabalho teve como objetivos: avaliar a agressividade e caracterizar molecularmente isolados de *P. ananatis*. Para a avaliação da agressividade, foram utilizados nove isolados de *P. ananatis* inoculados em três genótipos de milho (DKB230, AG9025 e 2B810PW) com quatro repetições. A severidade da mancha branca das folhas foi avaliada aos 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação usando uma escala de notas. Para caracterização molecular foram estudados 23 isolados de *P. ananatis* utilizando os primers específicos ANAF/ANAR e primer universal BOX. Os isolados UFU A18 e UFU B13 foram os mais agressivos, para os genótipos DKB230 e AG9025. Na caracterização molecular os isolados foram identificados como *P. ananatis* e apresentaram diversidade genética representada pela formação de nove grupos com similaridade no corte de 50%. O presente trabalho poderá auxiliar os programas de melhoramento genético, na seleção de híbridos de milho resistentes à bactéria.

Palavras-chave: Mancha branca; primers; PCR; *Zea mays*.

CHAPTER 1. AGGRESSIVENESS AND GENETIC DIVERSITY OF ISOLATES OF *Pantoea Ananatis*

ABSTRACT

The culture of maize (*Zea mays* L.) is of great importance in Brazilian agriculture due to the extensive cultivated area. The maize white spot, caused by *Pantoea ananatis* has occurrence endemic in some regions and for the control of the disease it is recommended the use of resistant genotypes. However, to obtain resistant genotypes to assess aggressiveness of isolates to be used and also know their genetic diversity. Therefore, this work had as objective: to assess the aggressiveness and molecularly characterize isolates of *P. ananatis*. For the assesment of aggressiveness, were used nine isolates of *P. ananatis* inoculated in three maize genotypes (DKB230, AG9025, 2B810PW); with four replications. The severity of white spot syndrome of leaves was evaluted at 2, 4, 6 and 8 days after inoculation, using a scale note. For molecular characterization were studied 23 isolates of *P. ananatis* using the specific primers ANAF/ANAR and universal primer BOX. . The UFU A18 and UFU B13 were the most aggressive, to the genotypes DKB230 and AG9025. The molecular characterization of theisolates were identified as *P. ananatis* and showed genetic diversity represented by the formation of nine groups with similarity in the cut of 50%. The present study may assist breeding programs in the selection of maize hybrids resistant to bacteria.

Keywords: Maize white spot; primers; PCR; *Zea mays*.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays L.*) tem grande importância no cenário da agricultura brasileira, a área plantada compreende grande parte do território nacional. Contudo, as modificações ocorridas ao longo dos anos no sistema de produção, como expansão da fronteira agrícola, adoção do sistema de plantio direto, aumento da população de plantas, condições climáticas favoráveis, além de cultivos sucessivos de milho na mesma área, geraram condições ideais para o desenvolvimento de várias doenças foliares (PAES, 2006). Destacando-se a mancha branca causada pela bactéria *Pantoea ananantis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001).

A doença tem ocorrência endêmica em algumas regiões do país, onde as perdas em produtividade podem ser superiores a 60% em condições de ambiente favorável e uso de genótipos suscetíveis (COSTA et al., 2009). A doença é favorecida por condições de temperatura moderada em torno de 14 °C e alta umidade do ar associada a frequentes períodos de chuva (SAWAZAKI et al., 1997). Caracterizada por lesões de formato elíptico a circular, aquosas do tipo anasarca, inicialmente de coloração verde-clara que ao final do ciclo da cultura tornam-se necróticas de cor palha, podendo variar em diâmetro e incidência nas folhas (COSTA et al., 2009). Segundo Fernandes e Oliveira (2000) os sintomas iniciam-se nas folhas inferiores das plantas de milho, evoluindo rapidamente em direção do ápice, sendo mais severos após o estágio de pendramento.

Devido uma produção intensa da cultura do milho, houve uma modificação na dinâmica populacional dos patógenos, promovendo um incremento na incidência e na severidade de doenças nas regiões produtoras (LANZA, 2009). Com isso, o estudo da agressividade de isolados se faz importante, visando auxiliar os programas de melhoramento na obtenção de genótipos resistentes.

A identificação da bactéria é feita por caracterização bioquímica, fisiológica e molecular (BOMFETI et al. 2008; FIGUEIREDO et. al., 2012; SCHAAD et al. 2001) dos isolados bacterianos. A caracterização molecular permite o estudo da variabilidade genética por meio da extração do DNA genômico, quantificação do DNA e amplificação do DNA genômico por oligonucleotídeos iniciadores. Permitindo o agrupamento de isolados bacterianos de acordo com diferentes fatores, como: condições ambientais, local de origem, material de coleta, entre outros. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo estudar agressividade e a diversidade genética de isolados de *Pantoea ananantis*, da cultura do milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em casa de vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Campus Umuarama.

2.1 Obtenção dos isolados de *Pantoea ananatis* e padronização do inóculo

Os isolados de *Pantoea ananatis* (Tabela 1) pertencentes à coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do ICIAG/UFU foram cultivados em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970). A suspensão bacteriana foi quantificada e calibrada em espectrofotômetro DO₅₅₀=0,5 a 10⁸ UFC.mL⁻¹.

TABELA 1. Isolados de *Pantoea ananatis* provenientes de diferentes hospedeiros e locais, pertencentes à coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG.

Isolado	Hospedeiro	Isolamento	Procedência
UFU A18	<i>Zea mays</i> L.	Folha	Morrinhos-GO
UFU B13	<i>Zea mays</i> L.	Folha	Planaltina de Goiás-GO
UFU D14	<i>Zea mays</i> L.	Folha	Uberlândia-MG
UFU D30	<i>Zea mays</i> L.	Folha	Uberlândia-MG
UFU E4	<i>Zea mays</i> L.	Folha	São João da Aliança-GO
UFU E43	<i>Zea mays</i> L.	Espiga	Uberlândia-MG
UFU E59	<i>Coffea</i> sp.	Ápice	Franca-SP
UFU F15	<i>Brachiaria</i> spp.	Folha	Uberlândia-MG
UFU F16	<i>Brachiaria</i> spp.	Folha	Uberlândia-MG
UFU F17	<i>Digitaria</i> spp.	Folha	Uberlândia-MG
UFU F19	<i>Panicum maximum</i>	Folha	Uberlândia-MG
UFU F20	<i>Cenchrus echinatus</i> L.	Folha	Romaria-MG
UFU F22	<i>Cenchrus echinatus</i> L.	Folha	Uberlândia-MG
UFU F40	<i>Zea mays</i> L.	Folha	Brasília-DF
UFU F49	<i>Zea mays</i> L.	Folha	Formosa-GO
UFU F50	<i>Zea mays</i> L.	Folha	Formosa-GO
UFU F52	<i>Zea mays</i> L.	Folha	Formosa-GO
UFU F55	<i>Zea mays</i> L.	Folha	Formosa-GO
UFU G13	<i>Zea mays</i> L.	Semente	Formosa-GO
UFU G48	<i>Zea mays</i> L.	Folha	Formosa-GO
UFU G73	<i>Zea mays</i> L.	Semente	Formosa-GO
UFU G74	<i>Zea mays</i> L.	Semente	Formosa-GO
UFU G75	<i>Zea mays</i> L.	Semente	Formosa-GO

2.1.1 Avaliação da agressividade de isolados de *Pantoea ananatis* em genótipos de milho

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos casualizados, em esquema fatorial (9x3x6). Sendo nove isolados bacterianos UFU A18, UFU B13, UFU D14, UFU E4, UFU E43, UFU F40, UFU F49 e UFU G13 e UFU G77 e três genótipos de milho DKB230 (suscetível), AGV9025 (suscetível) e 2B810PW (resistente) cedidos pela empresa Dow AgroSciences e seis repetições.

O cultivo foi em vasos de 500 g contendo solo, areia grossa e vermiculita na proporção de 3:1:1, com duas plantas por vaso. Plantas apresentando três a quatro folhas (aproximadamente 15 dias após a semeadura) foram inoculadas por aspersão (10^8 UFC mL⁻¹, OD₅₅₀ = 0,5) e submetidas à câmara úmida 24 h antes e após a inoculação.

A severidade da mancha branca das folhas foi avaliada aos 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação, usando uma escala de notas variando de 0 a 4, onde: 0 = folha sem sintoma, 1 = de 1 a 25% da folha lesionada, 2 = de 26 a 50% da folha lesionada, 3 = de 51 a 75% da folha lesionada, 4 = acima de 75% da folha lesionada.

A Área Abaixo da Curva de Progresso de Severidade (AACPS) foi calculada pela fórmula: $AACPS = \sum ((Y_i + Y_{i+1}) / 2) (t_{i+1} - t_i)$, onde: Y representa a intensidade da doença (nota atribuída de acordo com a escala diagramática usada); t é o tempo (intervalo entre as avaliações, em dias); e i representa o número de avaliações no tempo (SHANER e FINNEY, 1977). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (1953) a ($p \leq 0,05$), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

2.2 Caracterização molecular de isolados de *Pantoea ananatis* pela reação em cadeia polimerase

O DNA de 23 isolados de *Pantoea ananatis* foram avaliados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para o estudo da divergência genética utilizando o *primer* BOX e para identificação usando o par de *primers* específico ANAF/ANAR.

2.2.1 Extração do DNA

O DNA genômico bacteriano foi extraído conforme protocolo de extração de bactéria Gram negativa por meio do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega).

2.2.2 Quantificação do DNA

O DNA extraído foi quantificado em (ng/μl) por meio da leitura no NanoDrop (2000 Thermo Scientific) e a qualidade do DNA foi feita por meio da relação de absorbância das amostras à DO_{260}/DO_{280} .

2.2.3 Identificação de *Pantoea ananatis* por primers específicos

Os iniciadores específicos para *Pantoea ananatis*: ANAF (5'-CGT GAA ACT ACC CGT GTC TGT TGC-3') e ANAR (5'-TGC CAG GGC ATC CAC CGT GTA CGC T-3') permitiram à amplificação de uma sequência de DNA com aproximadamente 360 ou 388 pb (FIGUEIREDO e PACCOLA-MEIRELLES, 2012). Esses primers específicos são responsáveis por confirmar a identidade dos isolados bacterianos.

As reações de PCR foram realizadas na concentração e no volume final de 12,5 μL de reação, composta de 50 ng de DNA genômico, 1X tampão de PCR 10X com Mg^{2+} , 2,0 μM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP, e 1 U Taq DNA polimerase. A reação de amplificação foi realizada em termociclador ThermoHybaid: Omn-E seguindo protocolo para primer específicos ANAF/ANAR. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados com SYBR Safe, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

2.2.4 Diversidade genética de *Pantoea ananatis* pelo primer BOX

Os DNAs cromossômicos de cada isolado foram amplificados pela sequência repetitiva do primer BOX A1- R (5' – CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G – 3'). A reação foi realizada um volume final de reação de 12,5 μL contendo, 1 X tampão de PCR 10X, 0,2 mM de dNTP, 1 μM do primer BOX A1R, 1 U de Taq polimerase e 50 ng μL⁻¹ de DNA 10,5 μL. A reação de amplificação foi realizada em termociclador ThermoHybaid: Omn-E seguindo o protocolo para o primer BOX. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose como descrito anteriormente.

2.2.5 Dendrograma

Para o estudo da diversidade genética dos isolados foi gerado um dendrograma de similaridade gerado a partir do Coeficiente de Jaccard entre perfis dos isolados de *Pantoea ananatis*. Para os resultados obtidos através do iniciador BOX-PCR foi feita uma análise em

relação ao peso molecular, onde os fragmentos de mesmo peso molecular são considerados homólogos. Cada isolado recebeu um haplótipo combinado binário, onde os loci com a presença do gel translucido recebe o valor 1 e o loco ausente o valor 0. Para o cálculo da frequência dos haplótipos utilizou o programa Excel. Gerou o dendograma por meio de uma matriz de similaridade algoritmo UPGMA (método de médias aritméticas não ponderadas) no programa computacional DARwin 5.0 e o coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando-se o programa Genes (CRUZ, 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da agressividade de isolados de *Pantoea ananatis*

Para a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha branca do milho (Tabela 2) houve interação significativa entre os isolados de *Pantoea ananatis* e os genótipos analisados. Para o genótipo 2B810PW, considerado resistente, não houve ocorrência da doença, enquanto que para os genótipos susceptíveis DKB230 e AGV9025 foi observada a ocorrência da doença. Os isolados de *Pantoea ananatis* UFU A18 e UFU B13 apresentaram a maior severidade de doença diferindo significativamente dos demais para os dois genótipos de milho suscetíveis. Os isolados bacterianos UFU F40 e UFU F49 apresentaram agressividade intermediária e os isolados UFU D14, UFU E4, UFU E43, UFU G13 e UFU G77 foram os menos agressivos. Não houve correlação entre a agressividade dos isolados e sua origem geográfica.

A variação na agressividade dos isolados indica a possibilidade do patógeno possuir raças. De acordo com Brito et al. (2011) provavelmente devido alterações na população do patógeno por pressão de seleção direcional, em favor de raças mais agressivas, acelerada pelo aumento de fonte de inóculo no campo, em função de plantios sucessivos de safra e safrinha, ausência de rotação de cultura e utilização frequente de fungicidas. Entretanto, ainda não foi descrito a ocorrência de raças de *Pantoea ananatis* na cultura do milho no Brasil (SILVA e TEBALDI, 2018).

TABELA 2. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha branca do milho de diferentes isolados *Pantoea ananatis* e diferentes genótipos de milho. Uberlândia – MG.

Isolados	AACPD		
	DKB230	AGV9025	2B810PW
UFU A18	10,50bA	10,25bA	0,00aA
UFU B13	10,25bA	9,50bA	0,00aA
UFU F40	6,75bB	7,00bB	0,00aA
UFU F49	6,75bB	7,00bB	0,00aA
UFU D14	3,50bC	2,50bC	0,00aA
UFU G77	3,00bC	2,50bC	0,00aA
UFU G13	2,50bC	2,50bC	0,00aA
UFU E43	2,50bC	2,50bC	0,00aA
UFU E4	2,50bC	1,00 aC	0,00aA
CV (%)	19,55		

Médias seguidas de letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 0.005 de probabilidade.

Dentre as medidas de controle de doenças, a utilização de genótipos resistentes constitui uma fonte segura e sem riscos ambientais (EMBRAPA, 2009). No presente trabalho observou-se maior severidade da doença mancha branca nos genótipos suscetíveis. Segundo Costa et al. (2009) os sintomas encontrados em genótipos suscetíveis podem chegar a perdas superiores a 60% na produção. Beshpalhok et al. (2016) argumenta que a resistência de plantas à patógeno é um dos principais objetivos do melhoramento genético, uma vez que se torna mais barato o seu uso, além do menor impacto ambiental e benefícios ao produtor e consumidor. De acordo com Pereira et al. (2012) o uso de produtos químicos para o controle da mancha branca do milho não é eficiente e torna-se imprescindível a utilização de cultivares resistentes.

Nos programas de melhoramento genético, para a obtenção de variedades resistentes deve-se considerar a agressividade dos isolados a serem inoculados no hospedeiro, uma vez que a utilização de isolados menos agressivos podem mascarar a reação dos genótipos sem separá-los convenientemente em termos de resistência. Os isolados bacterianos estudados em experimentos de agressividade, geralmente são selecionados a partir do estudo de variabilidade genética do patógeno (NAKATANI et al. 2009). Com isso, é importante a identificação do patógeno por meio de primers específicos e o estudo de sua diversidade genética através de primers universais pela ferramenta da PCR.

3.2 Diversidade genética de isolados de *Pantoea ananatis*

Todos os DNAs dos 23 isolados bacterianos foram amplificados com o par de primers ANAF/ANAR específico para *Pantoea ananatis*, gerando um único fragmento de aproximadamente 380 pb, confirmando a identidade da bactéria como *Pantoea ananatis*. Estes resultados estão de acordo com Figueiredo e Paccola-meirelles (2012), que identificaram a presença da bactéria *Pantoea ananatis* associadas com a cultura do milho, sorgo e gramínea através da técnica da PCR, utilizando tais primers.

A análise de agrupamento dos isolados de *Pantoea ananatis* (Figura 1) tem por finalidade dividir os isolados em grupos com maior similaridade com um ponto de corte para divisão dos grupos em 50% do valor obtido na formação do grupo final, sendo neste trabalho separados em nove grupos. O grupo II alocou 4 isolados UFU F52, UFU G48, UFU F15 e

UFU F17, onde os dois últimos isolados possuem a mesma origem, do Município de Uberlândia, apesar de apresentarem hospedeiros diferentes. Entretanto, para os demais grupos foi observado que o local de origem não é fator preponderante na determinação da similaridade genética dos isolados, uma vez que, não há relação evidente entre a composição dos grupos com o local de origem.

Há variabilidade genética entre os isolados, pois há uma variação na distribuição das sequências BOX, indicando a existência de variação genotípica dos isolados, não podendo ser arranjados em grupos distintos em função do local de origem e da agressividade. O DNA cromossômico de cada isolado bacteriano foi amplificado de maneira diferente, pela sequência repetitiva do primer BOX, que amplifica regiões intergênicas distintas no genoma gerando padrões de bandas diferentes (PAIVA, 2014). Estudos realizados por Casais et al. (2014), utilizando a técnica de PCR para caracterização de *Xylella fastidiosa* em citros, em duas regiões diferentes no Estado da Bahia, encontraram relação da diversidade genética em função da região geográfica de cultivo do hospedeiro. Em contrapartida, outro estudo de variabilidade, não encontrou relação entre a região de coleta com os grupos formados (NAKATANI et al., 2009) e para isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em laranja doce (ZANUTTO et al., 2013).

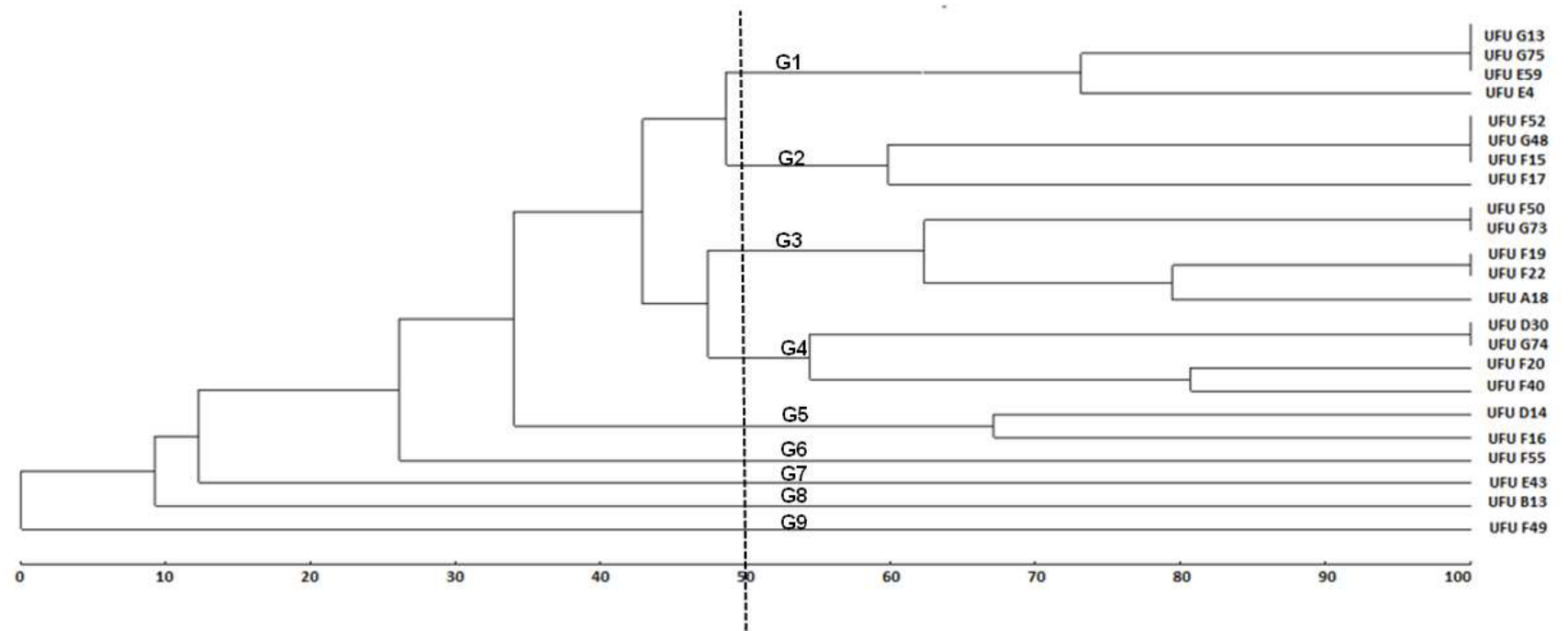


FIGURA 1. Dendrograma de 23 isolados de *Pantoea ananatis* de acordo com o índice de similaridade obtido pelo primer BOX.

4. CONCLUSÕES

O genótipo 2B810PW mostrou-se resistente a *Pantoea ananatis*.

Os isolados de *Pantoea ananatis* UFU A18 e UFU B13 apresentaram maior agressividade nos genótipos de milho susceptível.

A utilização de primers específicos ANAF/ANAR permitiu a identificação dos 23 isolados bacterianos de *Pantoea ananatis*.

Os isolados de *Pantoea ananatis* apresentaram diversidade genética, não sendo possível agrupá-los de acordo com a região geográfica e a agressividade.

REFERÊNCIAS

- BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Introdução ao Melhoramento de Plantas. In: **Melhoramento de Plantas**. 2016. Disponível em: <www.bespa.agrarias.ufpr.br>. Acesso em: 17 out. 2018.
- BOMFETI, C.A.; SOUZA-PACOLLA, E.A.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; MARRIEL, I.E.; MEIRELLES, W.F.; CASELA, C.R. & PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 1-6, 2008.
- BRITO, A. H.; PINHO, R. G.; SANTOS, A. O.; SANTOS, S. Reação de híbridos de milho e comparação de métodos para avaliação da Cercosporiose e Mancha Branca. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 36, n.1, p.291-301, 2011.
- CASAI, V. O.; PATROCINIO, E.; OLIVEIRA, S. A. S.; SCHNADELBACH, A. S.; BARBOSA, C. J.; BARBOSA, L. V. Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em regiões produtoras de citros na Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 1, p.26-33, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000100004>
- COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Doenças. In CRUZ, J. C. (Ed). **Cultivo do milho**. 5 ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.
- CRUZ, C. D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistemas de produção**. 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicações/milho_5_ed/doencas.htm>. Acesso em: 27 dez. 2017.
- FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais Doenças na Cultura do Milho**. Sete lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000, 80 p.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.
- FIGUEIREDO, J. E. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Simple, rapid and accurate PCR-based detection of *Pantoea ananatis* in maize, sorghum and *Digitaria* sp. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 94, n. 3, p. 663-667, 2012.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, Minn., US, v. 60, p. 969-976. 1970.
- LANZA, Fabrício Eustáquio. **MANCHA BRANCA DO MILHO (*Pantoea ananatis*): VARIABILIDADE NO PATÓGENO E RESISTÊNCIA GENÉTICA NO HOSPEDEIRO**. 2009. 16 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

NAKATANI, A. K.; LOPES, R.; CAMARGO, L. E. A. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p.116-120, 2009.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; FERREIRA, A. S.; MEIRELLES, W. F.; MARRIEL, I. E.; CASELA, C. R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 275-279, 2001.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2006. (Circular Técnica, 75).

PAIVA, B. A. R. **Caracterização fenotípica e molecular de *Xanthomonas axonopodis* PV. Phaseoli e *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, procedentes de regiões produtoras de feijoeiro comum no Brasil**. 70 f. 2014. Dissertação (Mestrado) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Goiânia, 2014.

PEREIRA, J. L. A. R.; UZAN, J.; REZENDE, E. S. J.; UZAN, B. Z.; ALEXANDRE, N. O.; BATISTA, E. C. Controle Químico da Mancha Branca na Cultura do Milho. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo 29, 2012, Água de Lindóia, **Anais...** Água de Lindóia, 2012. CDROM.

SAWAZAKI, E.; DUDIENAS, C.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; GALVÃO, J. C. C.; CASTRO, J. L.; PEREIRA, J. Reação de cultivares de milho à mancha de *Phaeosphaeria* no estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n. 6, p. 585-589, 1997.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory Guide for identification plant pathogenic bacteria**. 3th ed. Saint Paul: APS Press, 2001. 291 p.

SEBASTIÃO, F. A. **Validação de técnicas moleculares para o diagnóstico de bactérias em peixes, visando redução de tempo e custo**. 136 f. 2015. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jabotical, 2015.

SHANER, G. & FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology** 70:1183-1186. 1977. <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-1183>

SILVA, T.B.; TEBALDI, N.D. Caracterização de isolados de *Pantoea ananatis* e reação de genótipos de milho à bactéria. **Summa Phytopathologica**, v.44, n.3, p.283-285, 2018.
<https://doi.org/10.1590/0100-5405/170862>

TUKEY, J.W. **The problem of multiple comparisons**. Mimeographs Princeton University, Princeton: N.J, 1953, 396 p.

ZANUTTO, C. A.; SOARES, L. S.; ZULIANI, A. M. O. G.; NOCCHI, P. T. R.; CATANI, D. H. P.; NUNES, W. M. C. Citrus tristeza virus: study of the sequence of three genes from selected isolates. In: Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, 8, 2013, Maringá, **Anais...** Maringá: Cesumar, 2013, 4p.

CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE *Pantoea ananatis* NA CULTURA DO MILHO

RESUMO

A bactéria *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho ocorre com frequência em diferentes regiões produtoras de milho do país. O controle químico da doença não é eficiente e métodos adicionais devem ser avaliados. A utilização de nanopartículas na agricultura representa uma importante inovação tecnológica, esses nanomateriais têm sido utilizados como agentes antimicrobianos. As nanopartículas de ZnO produzem efeito bactericida e a dopagem desta com outros elementos podem alterar sua estrutura potencializando seu efeito. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de nanopartículas no controle da Mancha branca do milho (MBM) em condições controladas. Para o tratamento preventivo e curativo da doença, plantas de milho foram pulverizadas com nanocristais de ZnO dopados com quatro elementos: cobre (Cu), manganês (Mn), ferro (Fe) e níquel (Ni) em diferentes concentrações (10, 5 e 2,5 mg mL⁻¹), duas formas de controle e quatro repetições. As plantas foram inoculadas com suspensão bacteriana de *Pantoea ananatis* na concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹. A utilização de nanocristais de óxido de zinco (ZnO) apresentou efeito bactericida para *P. ananatis* quando dopadas com cobre e manganês. Recomenda-se a aplicação dos produtos para o controle preventivo ou curativo da bactéria *Pantoea ananatis*. Este é o primeiro relato da utilização de nanopartículas no controle fitobactérias in vivo, sendo uma tecnologia promissora.

Palavras-chave: Bactericida; Mancha branca; Nanocristais

CHAPTER 2. NANOPARTICLES IN CONTROL OF *PANTOEA ANANATIS* IN CORN CULTURE

ABSTRACT

The *Pantoea ananatis*, causal agent of maize white spot occurs frequently in different maize producing regions of the country. The chemical control of the disease is not efficient and additional methods should be evaluated. The use of nanoparticles in agriculture represents an important technological innovation; these nanomaterials have been used as antimicrobial agents. The Zinc oxide (ZnO) nanoparticles produce bactericidal effect and the doping this with other elements can change their structure leveraging its effect. This work had objective to evaluate the effect of nanoparticles in the control of maize white spot (MWS) under controlled conditions. For the preventive and curative treatment of the disease, maize plants were sprayed with nanoparticles of ZnO doped with four elements: copper (Cu), manganese (Mn), iron (Fe) and nickel (Ni) at different concentrations (10, 5 and 2.5, 5 mg mL⁻¹), two forms of control (preventive and curative), and four replications. The plants were inoculated with the bacterial suspension of *P. ananatis* at a concentration of 10⁸ CFU mL⁻¹. The use of ZnO nanocrystals showed bactericidal effect for *P. ananatis* when doped with Cu and Mn. It is recommended the application of the products for preventive or curative control of *P. ananatis*. This is the first report on the use of nanoparticles in control phyto bacterias in vivo, being a promising technology.

Keywords: Bactericide; Maize white spot; Nanocrystals.

1. INTRODUÇÃO

A mancha branca do milho (MBM) causada pela bactéria *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001) está presente em praticamente todas as áreas onde o milho (*Zea mays* L.) é cultivado no país. A ocorrência da doença é favorecida em condições de temperatura moderada e alta umidade relativa do ar (COSTA et al., 2010). A alta incidência da MBM pode reduzir a área fotossinteticamente ativa e causar perdas de até 60% na produção final (COSTA et al., 2009).

Dentre as estratégias de controle, a utilização de genótipos resistentes constitui uma fonte segura e sem riscos ambientais, uma vez que, a utilização de produtos químicos não vem apresentando a mesma eficiência (ROMEIRO, 2005), por isso, inovações tecnológicas devem ser avaliadas, como o uso de nanocristais com ação antimicrobiana. Com tamanho inferior a 100 nm, as nanopartículas (NPs) apresentam elevada eficácia biocida, já que o pequeno tamanho e a alta relação superfície/volume admite interações íntimas com as membranas microbianas (ALLAKER, 2010; MORONES et al., 2005).

A utilização de nanopartículas na agricultura representa uma importante inovação tecnológica, porém há necessidade de mais estudos para o conhecimento dos seus mecanismos de toxicidade em níveis celular e molecular, melhores dopagens e concentrações para obtenção de alta eficiência sobre os alvos. Elas podem ser utilizadas na produção de nanofertilizantes, nanocidas ou pesticidas encapsulados em nanopartículas para liberação controlada (FURLANETO, 2011).

As nanopartículas de ZnO produzem efeito bactericida através do aumento do nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs), no qual ocasionam vazamento da membrana plasmática, danos celulares e morte (WANG et al., 2014). As nanopartículas podem ser amorfas ou cristalinas, sendo que as cristalinas apresentam baixa genotoxicidade quando comparadas as amorfas. Quanto à forma, a forma esférica tem a penetração mais dificultada nas paredes celulares bacterianas, quando comparadas com formato de bastão ou fio (YANG et al., 2009). O nanocristal de ZnO pode ser ajustado alterando a estrutura física e eletrônica através da dopagem. A dopagem permite integrar novos elementos na estrutura da nanopartícula, modificando assim suas características químicas através do processo de substituição de íons por outros no cristal (CALLISTER JÚNIOR, 2002).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação de nanocristais de ZnO dopados com cobre, manganês, ferro e níquel no controle preventivo e curativo de *Pantoea ananatis*, em casa de vegetação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LABAC) e em Casa de Vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

2.1 Ensaio 1

2.1.1 Obtenção do isolado de *Pantoea ananatis* e padronização do inóculo

O isolado UFU A18 de *Pantoea ananatis* pertencente à coleção de trabalho do LABAC foi cultivado em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970). Após 48 h foi preparada uma suspensão bacteriana em água filtrada esterilizada e ajustada em espectrofotômetro para $OD_{550}=0,5$ (1×10^8 UFC mL⁻¹).

2.1.2 Obtenção dos nanocristais de ZnO

Os nanocristais de ZnO 0,1 Cu, ZnO 0,05 Fe, ZnO 0,2 Mn, ZnO 0,7 Ni foram sintetizadas no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores, do Instituto de Física da UFU e preparadas nas concentrações 5 e 10 mg mL⁻¹.

2.1.3 Condução e avaliação

O experimento foi em esquema fatorial (2x5x2), composto de 2 controles (preventivo e curativo), 5 produtos (4 tipos de nanopartículas e a água) e 2 concentrações das nanopartículas (10 e 5 mgmL⁻¹, com quatro repetições, sendo considerado como unidade experimental, um vaso contendo cinco plantas.

Em casa de vegetação, as plantas de milho do híbrido P1630H foram cultivadas em vasos com capacidade de 500 mL, contendo substrato solo, areia e húmus (3:1:1).

Para o controle preventivo, após 15 dias da semeadura, as plantas (três a quatro folhas) foram pulverizadas até o ponto de escorrimento com as nanopartículas e água, e três dias após as plantas foram inoculadas via pulverização das folhas com a suspensão bacteriana.

No controle curativo, as plantas foram inoculadas com suspensão bacteriana, e três dias após foram pulverizadas com as nanopartículas e água. Plantas pulverizadas com água foram consideradas as testemunhas. As plantas foram mantidas em câmara úmida 24 horas antes e após a inoculação.

A severidade da mancha branca foi avaliada aos 3, 6, 9 e 12 dias após a inoculação, usando uma escala de notas diagramática, variando de 0 a 4, onde: 0 = folha sem sintoma, 1 = de 1 a 25% da folha lesionada, 2 = de 26 a 50% da folha lesionada, 3 = de 51 a 75% da folha lesionada, 4 = acima de 75% da folha lesionada.

A Área Abaixo da Curva de Progresso de Severidade (AACPS) foi calculada pela fórmula: $AACPS = \sum((Y_i + Y_{i+1})/2)(t_{i+1} - t_i)$, onde: Y representa a intensidade da doença (nota atribuída de acordo com a escala diagramática usada); t é o tempo (intervalo entre as avaliações, em dias); e i representa o número de avaliações no tempo (SHANER e FINNEY, 1977).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (1953) a ($p \leq 0,05$), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

2.2 Ensaio 2

Idem ao primeiro experimento com exceção das doses testadas que foram (5 e 2,5 mg mL⁻¹), respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dados não houve interação significativa entre os nanocristais e os controles preventivo e curativo. No experimento 1 (Tabela 2) nanopartículas de ZnO 0,1 Cu e ZnO 0,2 Mn na concentração de 5 mg mL⁻¹ (Tabela 2), no primeiro ensaio, apresentaram menor área abaixo da curva do progresso da severidade da mancha branca do milho, portanto maior controle da mancha branca do milho, diferindo significativamente da testemunha. Resultados semelhantes foram obtidos no segundo experimento para o nanocristal dopado com na concentração de 5 mg mL⁻¹, diferindo significativamente da testemunha.

Os nanocristais de tamanhos menores possuem elevada área de superfície sendo mais eficazes em menores concentrações, atuando diretamente a superfície da membrana celular bacteriana e conseguindo se instalar dentro da mesma (SANTANA et al., 2015). Os mecanismos de ação inibitória dos nanocristais podem estar relacionados com a perda da capacidade de replicação do DNA da bactéria e a inativação das proteínas celulares (ARAB et al., 2017). Todos os nanocristais nesse estudo possuem o mesmo tamanho de 20 nm e forma de bastão, o que caracteriza essa forma esférica de penetração mais facilitada nas paredes celulares bacterianas.

TABELA 1. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha branca do milho, no controle preventivo e curativo da doença com diferentes nanocristais e concentrações. Uberlândia – MG.

Nanocristais	Ensaio 1			Ensaio 2		
	AACPD			AACPD		
	[mg/mL]	Preventivo	Curativo	[mg/mL]	Preventivo	Curativo
ZnO 0,1Cu	5	3,25	4,00	5	1,50	3,00
ZnO 0,1Cu	10	5,00	6,75	2,5	3,00	3,50
ZnO 0,2 Mn	5	2,25	4,00	5	6,00	4,00
ZnO 0,2Mn	10	6,00	4,00	2,5	5,00	3,50
ZnO 0,05Fe	5	4,50	5,75	5	9,00	8,25
ZnO 0,05Fe	10	4,50	6,50	2,5	9,00	7,75
ZnO 0,7Ni	5	6,50	4,50	5	6,00	7,50
ZnO 0,7Ni	10	5,75	4,66	2,5	8,00	6,50
Testemunha	0	10,50	10,50	0	10,00	10,00
Média		4,72	5,02		5,94	5,50
CV (%) 75,07				CV (%) 52,09		

ns – não significativo pelo teste F 5%.

TABELA 2. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha branca do milho com diferentes nanocristais em plantas de milho. Uberlândia – MG.

Ensaio 1			Ensaio 2	
Nanopartícula	[mg/mL]	AACPD ¹	[mg/mL]	AACPD ¹
ZnO 0,1Cu	5	3,62a	5	2,25a
ZnO 0,1Cu	10	5,87ab	2,5	3,25ab
ZnO 0,2Mn	5	3,12a	5	5,00abc
ZnO 0,2Mn	10	5,33ab	2,5	4,25abc
ZnO 0,05Fe	5	5,12ab	5	8,63cd
ZnO 0,05Fe	10	5,50ab	2,5	8,37bcd
ZnO 0,7Ni	5	5,50ab	5	6,75abcd
ZnO 0,7Ni	10	5,10ab	2,5	7,25abcd
Testemunha	0	10,50b	0	10,00d

Médias seguidas de letra iguais na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey¹ a 0,05 de probabilidade.

De acordo com Wijnhoven et al. (2009), a atividade antibacteriana de nanopartículas de prata foi dependente do tamanho, onde nanocristais de menor dimensão favorecem uma melhor penetração na membrana celular, podendo assim, prejudicar o funcionamento celular retardando a velocidade de suas atividades vitais e ocasionar danos celulares (MORONES, 2005; SHARMA, 2009). Consolini (2015) mostrou que as nanopartículas de prata afetaram a permeabilidade seletiva das células resultando em morte celular.

As NPs de ZnO apresentam atividade antimicrobiana contra uma vasta gama de microrganismos caracterizando como uma tecnologia promissora no controle de microrganismos (ESPITIA et al., 2012). De acordo com Mamede (2018) os nanocristais de ZnO dopados com Cu, Fe, Mn, Ni, Au e Ag inibiram o crescimento de *Pantoea ananatis in vitro*, corroborando com o presente resultado do controle da bactéria em plantas de milho, principalmente para os nanocristais de ZnO dopados com Cu e Mn, tendo ação bactericida na dosagem de 5 mg mL⁻¹. Entretanto, na concentração de 10 mg mL⁻¹ não foi possível confirmar ação bactericida dessas nanopartículas. Mamede (2018) também observou que ZnO dopado com Mn e Cu em menores concentrações resultaram em maiores halos de inibição, ao passo que, as maiores concentrações tiveram efeito toxico ou não apresentou halo de inibição. Em trabalho prévio aos ensaios realizados, testando doses maiores de nanocristais no controle de *Pantoea ananatis* foi observado fitotoxidez em plantas de milho.

Os nanocristais de ZnO dopado com Fe e Ni não apresentaram diferença significativa em relação a testemunha. Em contrapartida, esses nanocristais inibiram o crescimento *in vitro* da bactéria *Pantoea ananatis* (MAMEDE, 2018).

A maior parte dos produtos registrados para o controle de mancha branca são aqueles à base de cobre, uma vez que o cobre atua na proteção do tecido vegetal contra infecções bacterianas e redução da população de bactérias na superfície da folha (LEITE JÚNIOR, 2000). Na doença mancha aquosa do melão, causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* o uso de oxiclreto de cobre apresentou efeitos significativos no controle da doença, observando menor incidência da mesma (SALES JÚNIOR et al., 2005). No entanto, produtos de hidróxido de cobre e Oxiclreto de cobre usados para o controle de *Pantoea ananatis* foram fitotóxico para plantas de milho (BOMFETI et al., 2007). Assim, a utilização de nanocristais de ZnO dopados com Cu e Mn apresentam-se como uma fonte segura de controle da bactéria *Pantoea ananatis*, uma vez que as mesmas reduziram o crescimento bacteriano in vivo e não apresentou efeito fitotóxico nas dosagens estudadas.

Em estudo da atividade fotocatalítica do ZnO dopado com manganês, usando como fonte de radiação luz UV e luz visível e, contaminante o azul de metileno, observaram que esses nanocristais podem ser utilizados como eficiente fotocatalisador, que degrada contaminantes orgânicos com eficiência (ULLAH et al., 2008). Em estudo realizado por Rekha et al., (2010) utilizando nanopartículas de ZnO dopadas com Mn apresentaram atividade antibacteriana para *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*.

Apesar dos mecanismos de toxicidade não serem ainda totalmente conhecidos em nível celular e molecular (MEYER et al., 2011), as NPs de ZnO apresentam características bactericidas, sendo capaz de combater tanto os microrganismos, como seus esporos (SAWAI et al., 1996). Esse efeito bactericida das nanopartículas de ZnO pode ser explicado pelo aumento do nível intracelular de espécies reativas de oxigênio, vazamento da membrana plasmática, dano celular, genotoxicidade (efeito tóxico sobre o material genético) e morte (apoptose) (FUKUI et al., 2012; SHARMA et al., 2012; WANG et al., 2014).

TABELA 3. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha branca, com diferentes nanocristais, em plantas de milho. Uberlândia – MG.

	Experimento 1	Experimento 2
	AACPD	
Preventivo	4,72a	5,93a
Curativo	5,06a	5,50a
Testemunha	10.50b	10.0b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Quanto à forma de controle, tanto a aplicação na forma preventiva e curativa apresentaram bons resultados. De acordo com Rodrigues et al. (2015) o controle preventivo da mancha bacteriana do tomateiro com diferentes biofertilizantes foi mais eficiente e reduziram a severidade da doença, promovendo redução na utilização de agroquímicos e consequentemente menor impacto ambiental. O controle de doenças bacterianas, após sua manifestação no campo, é de difícil controle, por isso, além das diferentes formas de controle, deve-se adotar medidas de manejo integrado baseado em medidas preventivas (LOPES, 2009). Sendo assim, os nanocristais de ZnO dopados com Cu e Mn apresentam-se como uma tecnologia promissora para o controle da MBM.

4. CONCLUSÕES

Nanocristais de ZnO no formato de bastão dopados com cobre e manganês na dosagem de 5 mg mL⁻¹ reduziram a severidade da mancha branca do milho.

Tanto o controle preventivo e o curativo foram eficientes para o manejo da doença.

A utilização de nanocristais constitui uma inovação tecnológica no controle da bactéria *Pantoea ananatis* na cultura do milho.

REFERÊNCIAS

- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of Dental Research**, Amsterdam, v. 89, n. 11, p. 1175-1186, 2010. <https://doi.org/10.1177/0022034510377794>
- ARAB, F. E.; PARIS, E. C.; SOUZA, C. W. O.; FERREIRA, M. D. Avaliação do efeito antimicrobiano de nanopartículas de óxidos metálicos. In: Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 9, 2017, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa, 2017, p. 205 - 208.
- BOMFETI, C.A; MEIRELLES, W.F; SOUZA-PACCOLA, E.A.; CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; MARRIEL, I.E.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Avaliação de produtos químicos comerciais, in vitro e in vivo, no controle da doença foliar, mancha branca do milho, causada por *Pantoea ananatis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p.63-67, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052007000100009>
- CALLISTER JÚNIOR, W. D. **Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma introdução**. 9 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 912 p.
- CONSOLINI, G. **Síntese e atividade microbiana de nanopartículas metálicas**. 23 f. 2015. TCC (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2015.
- COSTA, R. V. da; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Doenças. In: CRUZ, J. C. (Ed.). Cultivo do milho. 6. ed. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2010.
- COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Doenças. In CRUZ, J. C. (Ed). **Cultivo do milho**. 5 ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.
- ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S.; MEDEIROS, E. A. A. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food and bioprocess technology**, New York, v. 5, p. 1447-1464, 2012.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.
- FUKUI, H.; HORIE, M.; ENDOH, S.; KATO, H.; FUJITA, K.; NISHIO, K.; KOMABA, L. K.; MARU, J.; MIYAUHI, A.; NAKAMURA, A.; KINUGASA, S.; YOSHIDA, Y.; HAGIHARA, Y.; IWAHASHI, H. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 198, n. 3, p. 29-37, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.04.007>
- FURLANETO, F. P. B. Nanotecnologia no setor agropecuário. **Pesquisa & Tecnologia**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 1-4, 2011.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, Minn., US, v. 60, p. 969-976. 1970.

LEITE JÚNIOR, R. P. Surviving with Citrus Canker in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Orlando, v. 2, p. 890-896, 2000.

LOPES, C. A. **Murcha Bacteriana ou Murchadeira - Uma Inimiga do Tomateiro em Climas Quentes**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 8 p. (Embrapa Hortaliças: Circular Técnica, 67).

MAMEDE, M. C. **Deteção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho e nanopartículas no controle da bactéria in vitro**. 78 f. 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

MEYER, K.; RAJANAHALI, P.; AHAMED, M.; ROWE, J. J.; HONG, Y. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1721-1726, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.08.011>

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The Bacterial effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; FERREIRA, A. S.; MEIRELLES, W. F.; MARRIEL, I. E.; CASELA, C. R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 275-279, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>

REKHA K. et al. Structural, optical, photocatalytic and antibacterial activity of zinc oxide and manganese doped zinc oxide nanoparticles. **Physica B: Condensed Matter**, Amsterdam, v. 405, n. 15, p. 3180-3185, 2010.

RODRIGUES, V. W. B.; BUENO, T. V.; TEBALDI, N. D. Biofertilizantes no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 1, p.94-96, 28 ago. 2015.

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

SALES JÚNIOR, R., OLIVEIRA, I.S., MARIANO, R.L.R., SILVA, G.F. & NUNES, G.H.S. Efeito de Kasugamicina e Oxiclóreto de Cobre no Controle da Mancha-Aquosa do Meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Recife, v. 30, n. 3, p.295-298, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000300014>

SANTANA, M. C.; GOMES, D. L. R.; MARCONE, G. P. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p.36-45, 2015.

SAWAI, J.; KAWADA, E.; KANOU, F.; IGARASHI, H.; HASHIMOTO, A.; KOKUGAN, T.; SHIMIZU, M. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. **Journal of chemical engineering of Japan**, Tokyo, v. 29, n. 4, p. 627-633, 1996.

SHANER, G. & FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology** 70:1183-1186. 1977. <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-1183>

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in colloid and interface science**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 83-96, 2009.

SHARMA, V.; ANDERSON, D.; DHAWAN, A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). **Apoptosis**, London, v. 17, n. 8, p. 852-870, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10495-012-0705-6>

TUKEY, J.W. **The problem of multiple comparisons**. Mimeographs Princeton University, Princeton: N.J, 1953, 396 p.

ULLAH, R.; DUTTA, J. Photocatalytic Degradation of Organic Dyes with Manganese Doped ZnO Nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 156, n. 3, p. 194-200, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.033>

WANG, B. et al. Toxicity of ZnO nanoparticles to macrophages due to cell uptake and intracellular release of zinc ions. **Jouranl of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 14, n. 8, p. 5688-5696, 2014.

WIJNHOFEN, S. W. P.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; HERBERTS, C. A.; HAGENS, W. I.; OOMEN, A. G.; HEUGENS, E. H. W.; ROSZEK, B.; BISSCHOPS, J.; GOSENS, I.; MEENT, D. V.; DEKKERS, S.; JONG, W. H.; ZIVERDEN, M. V.; SIPS, A. J. A. M.; GEERTSMA, R. E. Nano-silver: a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**, [S.I], v. 3, n. 2, p. 109-138, 2009.

YANG, H.; LIU, C.; YANG, D.; ZHANG, H.; XI, Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 29, n. 1, p. 69-78, 2009. <https://doi.org/10.1002/jat.1385>