

MORGANA COELHO MAMEDE

Dickeya zea, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*: DETECÇÃO EM
SEMENTES DE MILHO E CONTROLE COM O USO DE NANOPARTÍCULAS

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Agronomia –
Doutorado, área de concentração em
Produção Vegetal, para obtenção do título de
“Doutor”.

Orientadora
Prof.^a Dr.^a Nilvanira Donizete Tebaldi

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2023

MORGANA COELHO MAMEDE

Dickeya zae, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*: DETECÇÃO EM
SEMENTES DE MILHO E CONTROLE COM O USO DE NANOPARTÍCULAS

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Agronomia –
Doutorado, área de concentração em
Produção Vegetal, para obtenção do título de
“Doutor”.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2023.:

Prof. Dr. Alison Talis Martins Lima ICIAG-UFU

Prof. Dr. Hugo Cesar R. M. Catão ICIAG-UFU

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza UFLA

Prof.^a Dr.^a Alessandra Keiko Nakasone Empresa Amazônia Oriental

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

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL

2023

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

M264d Mamede, Morgana Coelho, 1991-
2023 *Dickeya zea*, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *Vasculorum* [recurso eletrônico] : detecção
em sementes de milho e controle com o uso de nanopartículas / Morgana Coelho Mamede. - 2023.

Orientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.8037> Inclui bibliografia.

1. Agronomia. I. Tebaldi, Nilvanira Donizete, (Orient.). II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Rodovia BR 050, Km 78, Bloco 1CCG, Sala 206 - Bairro Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902 Telefone: (34) 2512-6715/6716 - www.ppga.iciag.ufu.br - posagro@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agronomia				
Defesa de:	Tese, 002/2023, PPGAGRO				
Data:	Vinte e oito de fevereiro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	18:40
Matrícula do Discente:	11913AGR008				
Nome do Discente:	Morgana Coelho Mamede				
Título do Trabalho:	<i>Dickeya zae</i> , <i>Pantoea ananas</i> e <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vascolorum</i> : DETECÇÃO EM SEMENTES DE MILHO E CONTROLE COM O USO DE NANOPARTÍCULAS				
Área de concentração:	Produção Vegetal				
Linha de pesquisa:	Controle e Manejo Integrado de Doenças				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pósgraduação em Agronomia, assim composta: Professores Doutores: Alison Talis Mar ns Lima - UFU; Hugo César Rodrigues Moreira Catão - UFU; Ricardo Magela de Souza - UFLA; Alessandra Keiko Nakasone - Empresa Amazônia Oriental; Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU orientadora do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ul mada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

https://www.sei.ufu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=4786712&infra_siste... 1/2 08/03/2023, 15:26 SEI/UFU - 4272569 - Ata de Defesa - Pós-Graduação



Documento assinado eletronicamente por **Nilvanira Donizete Tebaldi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2023, às 18:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alison Talis Martins Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2023, às 18:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hugo Cesar Rodrigues Moreira Catão, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2023, às 18:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Keiko Nakasone, Usuário Externo**, em 01/03/2023, às 14:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Magela de Souza, Usuário Externo**, em 07/03/2023, às 15:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4272569** e o código CRC **FF2C22B7**.

Referência: Processo nº 23117.011636/2023-70 SEI nº 4272569

https://www.sei.ufu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=4786712&infra_siste... 2/2

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

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

À minha orientadora, Dr.^a Nilvanira Donizete Tebaldi, por sempre me incentivar, ensinar, apoiar e compartilhar seu conhecimento.

À técnica de laboratório, Lara Caroline Borges Moreira Mota, pelo carinho, apoio e auxílio em todos os momentos.

À Professora Dr.^a Anielle Christine Almeida Silva pelo fornecimento das nanopartículas.

Aos professores que compõem a banca pela gentileza e disponibilidade.

Aos amigos e familiares pela torcida.

E, acima de tudo, agradeço a Deus pela oportunidade concedida.

RESUMO

As doenças bacterianas causadoras de perdas à cultura do milho são: a mancha branca, causada por *Pantoea ananatis*, a estria bacteriana, causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* e a podridão do colmo, causada por *Dickeya zae*. Os objetivos com estes trabalhos são (i) avaliar o uso de meios de culturas semi-seletivos para a detecção de *D. zae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *Vasculorum*; (ii) avaliar a sobrevivência das bactérias em sementes de milho inoculadas; (iii) avaliar meios de cultura para a detecção de *D. zae* em sementes de milho naturalmente contaminadas; (iv) avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de nanopartículas (NPs) na inibição do crescimento de *D. zae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*, e (v) avaliar o uso de NPs de ZnO, NiO e NPs de ZnO dopadas com Ag em aplicação preventiva e curativa no controle da mancha branca e da estria bacteriana do milho. Os meios de cultura 523, TSA e XTS com adição de ciclohexamida podem ser recomendados para a detecção simultânea de *D. zae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*. As bactérias sobrevivem nas sementes e podem ser detectadas até 120 dias após o armazenamento. Há diferença na sensibilidade dos meios de cultura para a detecção de *P. ananatis* e *X. v. pv. vasculorum* nos períodos de armazenamento avaliados. E, entre os meios, o meio TSA é o mais indicado com melhor desempenho e maior sensibilidade. *Dickeya zae* foi detectada nos três lotes de sementes. O meio de cultura TSA, com adição de ciclohexamida pode ser recomendados para detecção de *D. zae* em sementes de milho, em análise de rotina. A desinfestação prévia das sementes favorece a identificação dos isolados e reduz o crescimento de contaminantes. NPs de ZnO e ZnOCl não apresentaram atividade antibacteriana para *D. zae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NPs de ZnO e ZnOCl dopadas com Ag, NPs de ZnO dopadas com K e Mo e os óxidos de Ag, Cu e Ni inibiram o crescimento *n vitro* com maior atividade antibacteriana para os isolados de *D. zae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*. O hidróxido de cobre apresentou atividade antibacteriana apenas para *D. zae*. NPs de ZnO dopadas com Ag em diferentes concentrações e NPs de NiO reduziram a severidade da mancha branca e da estria bacteriana do milho em aplicações preventivas e curativas. O hidróxido de cobre aumentou a severidade da mancha branca e reduziu a severidade da estria bacteriana do milho.

Palavras-chave: estria bacteriana, mancha branca, podridão bacteriana, *Zea mays*.

ABSTRACT

Bacterial diseases that cause losses to the maize crop are: white spot, caused by *Pantoea ananatis*, bacterial streak, caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* and stem rot, caused by *Dickeya zae*. The objectives of these works are (i) to evaluate the use of semi-selective culture media for the detection of *D. zae*, *P. ananatis* and *X. vasicola* pv. *vasculorum*; (ii) to evaluate bacterial survival in inoculated corn seeds; (iii) evaluate culture media for the detection of *D. zae* in naturally contaminated corn seeds; (iv) to evaluate the in vitro antibacterial activity of nanoparticles (NPs) in inhibiting the growth of *D. zae*, *P. ananatis* and *X. vasicola* pv. *vasculorum*, and (v) evaluate the use of ZnO NPs, NiO and Ag-doped ZnO NPs in preventive and curative application in the control of white spot and bacterial stripe in maize. Culture media 523, TSA and XTS with the addition of cyclohexamide can be recommended for the simultaneous detection of *D. zae*, *P. ananatis* and *X. vasicola* pv. *vasculorum*. The bacteria survive in the seeds and can be detected up to 120 days after storage. There is a difference in the sensitivity of the culture media for the detection of *P. ananatis* and *X. v. pv. vasculorum* in the evaluated storage periods. And, among the media, the TSA medium is the most suitable with better performance and greater sensitivity. *Dickeya zae* was detected in all three seed lots. The TSA culture medium, with the addition of cyclohexamide, can be recommended for the detection of *D. zae* in maize seeds, in routine analysis. Prior seed disinfection favors the identification of isolates and reduces the growth of contaminants. ZnO and ZnOCl NPs did not show antibacterial activity against *D. zae*, *P. ananatis* and *X. vasicola* pv. *vasculorum*. Ag-doped ZnO and ZnOCl NPs, K and Mo-doped ZnO NPs and Ag, Cu and Ni oxides inhibited in vitro growth with greater antibacterial activity for *D. zae* isolates *P. ananatis* and *X. vasicola* pv. *vasculorum*. Copper hydroxide showed antibacterial activity only for *D. zae*. Ag-doped ZnO NPs at different concentrations and NiO NPs reduced the severity of maize white spot and bacterial streak in preventive and curative applications. Copper hydroxide increased white spot severity and reduced maize bacterial streak severity.

Keywords: bacterial leaf streak, white spot, bacterial wilt, *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2. SOBREVIVÊNCIA E DETECÇÃO DE *Dickeya zae*, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* EM SEMENTES DE MILHO

- Figura 2.1.** Colônias de *D. zae* (D.z.), *P. ananatis* (P.a.) e *X. vasicola* pv. *vasculorum* (X.v.v.), nos meios XTS, TSA, YDC, NA, 523 e PSA, com adição de ciclohexamida.....15
- Figura 2.2.** Detecção simultânea de *D. zae* (D), *P. ananatis* (P) e *X. vasicola* pv. *vasculorum* (X), nos meios de cultura NA, 523, PSA XTS, TSA e YDC, com adição de ciclohexamida.....30
- Figura 2.3.** Inoculação de sementes de milho. (A) Meio 523 (B) Meio XTS (C) Meio TSA. Sementes com presença de *D. zae* (1), *P. ananatis* (2), *X. vasicola* pv. *vasculorum* (3) e não inoculada (4).....32
- Figura 2.4.** Equação de regressão em função do tempo de armazenamento das sementes de milho inoculadas com *D. zae*.....33
- Figura 2.5.** Equação de regressão em função do tempo de armazenamento das sementes de milho inoculadas com *P. ananatis*.....34
- Figura 2.6.** Presença de contaminantes entre 30 e 90 dias após a inoculação com *X. vasicola* pv. *vasculorum* nos meios de cultura 523, TSA e XTS, com adição de ciclohexamida.....36
- Figura 2.7.** Equações de regressão em função do tempo de armazenamento das sementes de milho inoculadas com *X. vasicola* pv. *vasculorum*.....36

CAPÍTULO 3. DETECÇÃO DE *Dickeya zae* EM SEMENTES DE MILHO

- Figura 3.1.** Detecção de *Dickeya zae* em extrato de semente diluído 10^{-1} nos meios de cultura 523, TSA e XTS das amostra de sementes infestadas (I) e desinfestadas (D).....48

CAPÍTULO 4 NANOPARTÍCULAS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Dickeya zae*, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* IN VITRO

- Figura 4.1.** Esquema de distribuição dos discos de papel em placas de Petri contendo meio de cultura. (A) Água filtrada autoclavada, (10^{-2}) 2x diluído, (10^{-1}) 1x diluído, (ND) não diluído e (AN) antibiótico.....59
- Figura 4.2.** Halo de inibição de *D. zae* por nanopartículas puras. (A) Ag₂O; (B) CuO; (C) NiO; (D) Hidróxido de cobre.....61

Figura 4.3. Halo de inibição em <i>P. ananatis</i> por NPs dopadas. (A) ZnO:1,0K; (B) ZnO:10,0K; (C) ZnO:0,5Mo; (D) ZnO:1,0Mo.....	63
Figura 4.4. Halo de inibição em <i>X. vasicola</i> pv. <i>vascolorum</i> por nanopartículas de ZnO:Ag. (A) ZnO:0,7Ag; (B) ZnO:1,0Ag; (C) ZnO:9,0Ag e (D) ZnO:11,0Ag.....	64
Figura 4.5. Halo de inibição de <i>X. vasicola</i> pv. <i>vascolorum</i> por nanopartículas puras. (A) Ag ₂ O; (B) CuO e (C) NiO.....	64

CAPÍTULO 5. NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE DOENÇAS BACTERIANAS FOLIARES NA CULTURA DO MILHO

Figura 5.1. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha branca do milho, causada por <i>P. ananatis</i>	74
Figura 5.2. Escala diagramática para avaliação da severidade da estria bacteriana do milho, causada por <i>X. vasicola</i> pv. <i>vascolorum</i>	75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2. SOBREVIVÊNCIA E DETECÇÃO DE *Dickeya zea*, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* EM SEMENTES DE MILHO

Tabela 2.1. Diâmetro (mm) de colônias de <i>D. zea</i> , <i>P. ananatis</i> e <i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> em diferentes meios de cultura.....	26
Tabela 2.2. Número de unidades formadora de colônias (UFC mL ⁻¹) de <i>D. zea</i> , <i>P. ananatis</i> e <i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> em diferentes meios de cultura.....	27
Tabela 2.3. Diâmetro (mm) das colônias de <i>D. zea</i> , <i>P. ananatis</i> e <i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> detectadas simultaneamente nos meios de cultura.....	30
Tabela 2.4. Número de unidades formadoras de colônias (UFC mL ⁻¹) de <i>D. zea</i> , <i>P. ananatis</i> e <i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> detectadas simultaneamente nos diferentes meios de cultura.....	30
Tabela 2.5. Número (n) de sementes infestadas artificialmente por <i>D. zea</i> e <i>P. ananatis</i> nos diferentes meios de cultura.....	32
Tabela 2.6. Número (n) de sementes de milho inoculadas com <i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> nos diferentes meios de cultura e tempos de armazenamento.....	34

CAPÍTULO 3. DETECÇÃO DE *Dickeya zea* EM SEMENTES DE MILHO

Tabela 3.1. Detecção de <i>Dickeya zea</i> em sementes naturalmente infestadas (UFC g de semente ⁻¹) sem desinfestação.....	48
Tabela 3.2. Detecção de <i>Dickeya zea</i> em sementes naturalmente infestadas (UFC g de semente ⁻¹) e desinfestadas.....	49

CAPÍTULO 4. NANOPARTÍCULAS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Dickeya zea*, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* IN VITRO

Tabela 4.1. Nanopartículas em suas respectivas concentrações. Uberlândia - MG, 2021.....	58
Tabela 4.2. Halo de inibição do crescimento (cm) de <i>D. zea</i> por NPs a 10 mg mL ⁻¹	60
Tabela 4.3. Halo de inibição do crescimento (cm) de <i>P. ananatis</i> por nanopartículas a 10 mg mL ⁻¹	62

Tabela 4.4. Halo de inibição do crescimento (cm) de <i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> por NPs a 10mg mL ⁻¹	63
---	----

CAPÍTULO 5. NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE DOENÇAS BACTERIANAS FOLIARES NA CULTURA DO MILHO

Tabela 5.1. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da mancha branca (MBM) e da estria bacteriana do milho (EBM), em aplicação preventiva e curativa com diferentes nanopartículas (NPs), ensaio 1.....	75
--	----

Tabela 5.2. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da mancha branca (MBM) e da estria bacteriana do milho (EBM), em aplicação preventiva e curativa com diferentes nanopartículas (NPs), ensaio 2.....	76
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	16
CAPÍTULO 2.....	22
SOBREVIVÊNCIA E DETECÇÃO DE <i>Dickeya zeae</i>, <i>Pantoea ananatis</i> e <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vascolorum</i> EM SEMENTES DE MILHO.....	22
RESUMO	22
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
1 Preparo da suspensão bacteriana	25
2 Avaliação da supressividade e repressividade dos meios de cultura.....	25
3 Inoculação de sementes de milho.....	26
4 Sobrevivência e detecção em sementes de milho.....	26
5 Análise estatística	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
Supressividade e repressividade dos meios de cultura	27
Sobrevivência e detecção da bactéria em sementes de milho armazenadas	32
CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 3.....	48
DETECÇÃO DE <i>Dickeya zeae</i> EM SEMENTES DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADAS	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO	52

CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	55
CAPÍTULO 4	63
NANOPARTÍCULAS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Dickeya zeae</i>, <i>Pantoea ananatis</i> e <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> IN VITRO	63
RESUMO	63
ABSTRACT	64
INTRODUÇÃO	65
MATERIAL E MÉTODOS	66
1 Preparo dos isolados.....	66
2 Preparo das nanopartículas (NPs).....	67
3 Determinação da toxidez das nanopartículas as diferentes bactérias	67
4 Análise estatística	68
RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	75
CAPÍTULO 5	84
NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE DOENÇAS BACTERIANAS FOLIARES NA CULTURA DO MILHO	84
RESUMO	84
ABSTRACT	85
INTRODUÇÃO	86
MATERIAL E MÉTODOS	87
1 Preparo dos isolados.....	87
2 Preparo das nanopartículas (NPs).....	87
3 Condução, aplicação e avaliação.....	88

4 Análise estatística	90
RESULTADOS.....	90
CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICE 1 - Protocolo dos meios de cultura	103

INTRODUÇÃO GERAL

O milho *Zea mays* L., é uma planta da família *Poaceae*, originária da América Central, cultivado em praticamente todas as regiões do mundo em climas úmidos e regiões secas. Em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, o milho constitui-se em um dos mais importantes cereais consumidos no mundo (LOPES; DANTAS; FERREIRA, 2020).

É um dos cereais mais cultivados no mundo, o Brasil é o terceiro país com maior produção mundial de milho (116,0 milhões de t), ficando atrás apenas de China (272,6 milhões de t) e EUA (382,9 milhões de t) (FIESP, 2022). Vários fatores levaram ao aumento da área de cultivo do milho: elevação do nível tecnológico dos produtores, mudanças no manejo, adoção do plantio direto, adoção de sistemas de irrigação, plantio na safra de verão e na safrinha, uso de sementes de alta qualidade, tratamentos fitossanitários (CUNHA et al., 2019) com conseqüente aumento na produção do grão.

Na implantação da cultura a escolha de sementes de alta qualidade é etapa que merece atenção pois está entre os fatores responsáveis por altos índices de produtividade e sucesso da lavoura. A qualidade das sementes é determinada por aspectos físicos, fisiológicos, genéticos e sanitário (TOLEDO et al., 1999). O uso de sementes de alta qualidade auxilia na formação de plântulas vigorosas com maior uniformidade e rapidez no estande (ALVERENGA et al., 2020).

O rendimento final da cultura está relacionado a vários fatores, potencial produtivo do genótipo, resistência às doenças, fertilidade do solo, densidade de plantas, sistema de cultivo e de semeadura, manejo de pragas e doenças além das condições ambientais. Modificações no sistema de produção que resultaram no aumento da produtividade (SILVA; COTA; COSTA, 2015) favoreceram o desenvolvimento de patógenos e aumentaram a severidade das doenças. Dentre as doenças que mais limitam o potencial produtivo da cultura destacam-se as doenças foliares (CUNHA et al., 2019).

A importância de cada doença varia de ano para ano e região para região, entre as doenças são de ocorrência mais generalizada nas principais regiões de plantio está a Mancha Branca do Milho (MBM). Causada pela bactéria *Pantoea ananatis* (sin. *Erwinia ananas*) (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001) a doença possui ampla distribuição geográfica, principalmente em plantios de segunda safra (GOSZCZYNSKA et al., 2006). Sua incidência é favorecida em locais com temperatura moderada (em torno de 14°C) e alta umidade do ar (SAWAZAKI; DUDIENAS, 1997)

O início da doença se dá com o surgimento de lesões aquosas, do tipo anasarca, de coloração verde-escuro e que evoluem para lesões necróticas e de coloração palha que podem coalescer com a evolução da doença. São lesões de formato oblongo e irregular, medindo entre 0,3 a 2,0 cm, dependendo do nível de resistência genética do material (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2002).

Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* (LANG et al., 2017) identificada como agente causal da Estria Bacteriana do Milho (EBM) foi recentemente confirmada no Brasil (LEITE et al., 2019; SAGATA et al., 2018). Descrita inicialmente no sul da África (DYER, 1949), a doença atingiu proporções quase epidêmicas nos EUA, com altos índices de severidade (superiores a 90%) e área foliar infectada superior a 50% (ARIAS et al., 2020; ORTIZ-CASTRO et al., 2020).

A bactéria pode sobreviver em restos culturais de milho da safra anterior e servir como fonte de inóculo. Conforme as sementes de milho são depositadas sobre o resíduo as plântulas que emergem entram em contato com a bactéria e eventualmente são contaminadas e podem desenvolver a doença (CASTRO, 2019). Os sintomas iniciais da doença são pequenos pontos encharcados nas folhas que então se expandem para formar lesões lineares, longas, amarelas a marrom-escuras que geralmente ficam restritas aos espaços internervais e em casos graves, podem cobrir até 60% da área foliar e causar murchamento da planta (KORUS et al., 2017; LANG et al., 2017; LEITE JR et al., 2018; PLAZAS et al., 2018; QHOBELA; CLAFLIN; NOWELL, 1990).

Identificada por Reifschneider e Lopes (1982) no Brasil a bactéria *Dickeya zeae* (SAMSON et al., 2005) (Sin: *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*) infecta uma ampla variedade de plantas e causa a podridão bacteriana. A bactéria coloniza o órgão vegetal e os sintomas de podridão-mole advêm da produção de enzimas pectinolíticas (GOODMAN; KIRALY; WOOD, 1986). Os sintomas incluem a descoloração da bainha da folha, maceração do caule e dos entrenós basais que resulta no amolecimento e descoloração dos tecidos infectados, levando a um odor fétido e, por fim, a planta tomba, resultando em graves perdas de rendimento de grãos (KUMAR; HUNJAN; SINGH, 2015).

Diante disso, os objetivos destes trabalhos são (i) avaliar o uso de meio de culturas semi-seletivos para a detecção de *Dickeya zeae*, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*; (ii) avaliar a sobrevivência das bactérias em sementes de milho inoculadas; (iii) avaliar meios de cultura para a detecção de *D. zeae* em sementes de milho naturalmente contaminadas; (iv) avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de NPs na inibição do crescimento de *D. zeae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*; e (v) avaliar o uso de NPs de ZnO, NiO e NPs de ZnO dopadas com Ag em aplicação preventiva e curativa no controle da mancha branca do milho e da estria bacteriana do milho.

REFERÊNCIAS

ALVERENGA, G. *et al.* Sementes de milho tratada: substratos e metodologia alternativa para o teste de germinação. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 6, p. 41190–41210, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-600>. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/12312/10317>. Acesso em: 14 jun. 2023.

ARIAS, S. L. *et al.* Occurrence in Seeds and Potential Seed Transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Maize in the United States. **Phytopathology**®, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1139–1146, march. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-19-0306-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-08-19-0306-R#>. Acesso em 15 jun 2023.

CASTRO, M. C. O. **Understanding the disease ecology of the corn bacterial leaf streak pathogen *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum***. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade do Colorado, Fort Collins, 2019.

CUNHA, B. A. DA *et al.* Influência da época de semeadura na severidade de doenças foliares e na produtividade do milho safrinha. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 45, n. 4, p. 424–427, fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/188038>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/zQP8Pg83khSrZwMGryWy6yQ/?lang=pt>. Acesso em 15 jun. 2023.

DYER, R. A. Botanical surveys and control of plant diseases. **Farming in South Africa**, [s. l.], v. 24, n. 275, p. 119- 121, 1949.

Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP). **Safra Mundial de Milho 2022/23** – 8º levantamento do USDA, São Paulo, dez. 2022. Disponível em: <https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/file-20221213172618-boletimmilhodezembro2022/> . Acesso em 15 jun. 2023.

GOODMAN, R. N.; KIRALY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986.

GOSZCZYNSKA, T. *et al.* Isolation and identification of *Pantoea ananatis* from onion seed in South Africa. **Seed Science and Technology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 655–668, out. 2006. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2006.34.3.12> . Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ista/sst/2006/00000034/00000003/art00012>. Acesso em 16 de jun. 2023.

KORUS, K. *et al.* First Report of *Xanthomonas vasicola* Causing Bacterial Leaf Streak on Corn in the United States. **Plant Disease**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 1030, jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1426-PDN>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-16-1426-PDN>. Acesso em 16 de jun. 2023.

KUMAR, A.; HUNJAN, M. S.; SINGH, H. K. AND P. P. Characterizing diversity of *Dickeya zea* causing bacterial stalk rot of maize based on biochemical assays and antibiotic sensitivity. **Indian Phytopathology**, Punjab, v. 68, n. 4, p. 375-379, 2015.

LANG, J. M. *et al.* Detection and Characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. Causing Bacterial Leaf Streak of Corn in the United States. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 107, n. 11, p. 1312–1321, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0168-R> . Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-05-17-0168-R>. Acesso em 16 jun. 2023.

LEITE JR, R. P. *et al.* Estria Bacteriana do Milho no Paraná. **Informe da Pesquisa**, Londrina, n. 160, p. 7-18, jul. 2018.

LEITE, R. P. *et al.* First Report of the Occurrence of Bacterial Leaf Streak of Corn Caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 145–145, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1100-PDN> . Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-06-18-1100-PDN>. Acesso em 17 jun. 2023.

LOPES, J. R. F.; DANTAS, M. P.; FERREIRA, F. E. P. Identificação da influência da pluviometria no rendimento do milho no semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, Fortaleza, v. 13, n. 5, p. 3610–3618, 16 abr. 2020. DOI:

<https://doi.org/10.7127/RBAI.V13N5001119> . Disponível em:
<https://inovagri.org.br/revista/index.php/rbai/article/view/1119>. Acesso em 17 jun. 2023.

ORTIZ-CASTRO, M. *et al.* Current Understanding of the History, Global Spread, Ecology, Evolution, and Management of the Corn Bacterial Leaf Streak Pathogen, *Xanthomonas vasculorum* pv. *vasculorum*. **Phytopathology**[®], [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1124–1131, 9 abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-20-0018-PER>. Disponível em:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-01-20-0018-PER>. Acesso em 17 jun. 2023.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *et al.* Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, [s. l.], v. 149, n. 5, p. 275–279, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x> . Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>. Acesso em 17 jun. 2023.

PLAZAS, M. C. *et al.* First Report of *Xanthomonas vasculorum* Causing Bacteria Leaf Streak of Maize (*Zea mays*) in Argentina. **Plant Disease**, [s. l.], v. 102, n. 5, p. 1026–1026, maio 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1578-PDN> . Disponível em:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-17-1578-PDN>. Acesso em 17 jun. 2023.

QHOBELA, M.; CLAFLIN, L. E.; NOWELL, D. C. Evidence that *Xanthomonas campestris* pv. *zeae* can be distinguished from other pathovars capable of infecting maize by restriction fragment length polymorphism of genomic DNA. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 183–186, jun. 1990. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060669009501024> . Disponível em:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07060669009501024>. Acesso em 17 jun. 2023.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; LOPES, C. A. Bacterial Top and Stalk Rot of Maize in Brazil. **Plant Disease**, [s. l.], v. 66, p. 519–520, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-66-519>. Disponível em:
https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1982Abstracts/PD_6_519.htm. Acesso em 17 jun. 2023.

SAGATA, E. *et al.* First Report of *Xanthomonas vasculorum* Causing Bacterial Leaf Streak of Maize (*Zea mays*) in Brazil. **Plant Disease**, [s. l.], p. PDIS-07-18-1174-PDN, 12 nov.

2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1174-PDN>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-07-18-1174-PDN>. Acesso em 17 jun. 2023.

SAMSON, R. *et al.* Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 1415–1427, 1 jul. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.02791-0>. Acesso em 17 jun. 2023.

SAWAZAKI, E. *et al.* 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.

SILVA, D. D.; COTA, L. V.; COSTA, R. V. Cultivo do Milho: Doenças. **Embrapa Milho e Sorgo**, 2015. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaof6_lga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7905&p_r_p_-996514994_topicoId=8666. Acesso em 22 jun. 2023.

TOLEDO, F. F. DE *et al.* VIGOR DE SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.) AVALIADO PELA PRECOCIDADE DE EMISSÃO DA RAIZ PRIMÁRIA. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 191–196, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90161999000100026> . Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/N9RthyjMsRNFQdMpTGvFKnB/?lang=pt>. Acesso em 19 jun. 2023.

CAPÍTULO 2

SOBREVIVÊNCIA E DETECÇÃO DE *Dickeya zea*, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* EM SEMENTES DE MILHO

RESUMO

O uso de sementes de qualidade é essencial para a expressão da capacidade produtiva da lavoura. Garantir a maior qualidade da semente é garantir maior rendimento da cultura de forma segura. Há muitos fatores que afetam a qualidade das sementes, dentre estes destacam-se os fatores sanitários. Os objetivos com estes trabalhos são: (i) avaliar o uso de meio de culturas semi-seletivos para a detecção de *Dickeya zea* (*D. zea*), *Pantoea ananatis* (*P. ananatis*) e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*X. vasicola* pv. *vasculorum*); (ii) avaliar a sobrevivência das bactérias em sementes inoculadas. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias, da UFU. Isolados bacterianos de *P. ananatis* (UFU A18), *X. vasicola* pv. *vasculorum* (UFU J29) e *D. zea* (UFU M58) foram recuperados e multiplicados em meio de cultura 523 por 24-48 horas a 28 °C. Avaliou-se a supressividade e repressividade de seis meios de cultura: 523, TSA, YDC, NA, PSA e XTS, com adição do fungicida ciclohexamida. E, a partir do armazenamento de sementes de milho inoculadas avaliou-se a sobrevivência e detecção das bactérias em 5 períodos de armazenamento (3, 30, 60, 90, 120 dias após a inoculação). Os dados foram analisados com o software R. Os meios de cultura 523, TSA e XTS com adição de ciclohexamida podem ser recomendados para a detecção simultânea de *D. zea*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*. As bactérias sobrevivem nas sementes e podem ser detectadas até 120 dias após o armazenamento.

Palavras-chave: inoculação; meio de cultura; bactéria.

ABSTRACT

The use of quality seeds is essential for the expression of the crop's productive capacity. Ensuring the highest quality of the seed is to ensure the highest yield of the crop in a safe way. There are many factors that affect seed quality, among which sanitary factors stand out. The objectives of these works are: (i) to evaluate the use of semi-selective culture medium for the detection of *Dickeya zae* (*D. zae*), *Pantoea ananatis* (*P. ananatis*) and *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*X. vasicola* pv. *vasculorum*); (ii) to evaluate the survival of bacteria in inoculated seeds. The experiments were carried out at the Laboratory of Vegetal Bacteriology, at the Institute of Agricultural Sciences, at UFU. Bacterial isolates of *P. ananatis* (UFU A18), *X. vasicola* pv. *vasculorum* (UFU J29) and *D. zae* (UFU M58) were recovered and grown in culture medium 523 for 24-48 hours at 28 °C. The suppressiveness and repressiveness of six culture media were evaluated: 523, TSA, YDC, NA, PSA and XTS, with the addition of cyclohexamide fungicide. And, from the storage of inoculated corn seeds, the survival and detection of bacteria were evaluated in 5 storage periods (3, 30, 60, 90, 120 days after inoculation). Data were analyzed using R software. Culture media 523, TSA and XTS with the addition of cyclohexamide can be recommended for the simultaneous detection of *D. zae*, *P. ananatis* and *X. vasicola* pv. *vasculorum*. The bacteria survive in the seeds and can be detected up to 120 days after storage.

Keywords: inoculation; culture medium; bacterium.

INTRODUÇÃO

A escolha de sementes certificadas e o uso de sementes de qualidade é regra fundamental para que se alcance a expressão máxima da capacidade produtiva de um material (PERLIN, 2021; SALES, 2021). As cultivares atuais de milho produzem cerca de cinquenta vezes mais do que o milho primitivo e o uso de sementes de alta qualidade exerce papel primordial na uniformidade e rapidez para a formação de plantas vigorosas (ALVERENGA et al., 2020; FILHO; BORGHI, 2020). A Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) prêve uma produção total de 125,8 milhões de toneladas de milho para a safra 2022/23 e produtividade de 5.600 kg ha⁻¹, com aumento de 3,5% na área semeada (2337,6 mil ha) (CONAB, 2022).

A qualidade refere-se à integração entre parâmetros genéticos, físicos e sanitários da semente que proporcionem a execução de suas funções vitais, além do desenvolvimento de uma nova plântula (PERLIN, 2021). Entre os microrganismos que podem associar-se à semente, as bactérias reúnem o segundo maior grupo, atrás apenas dos fungos. As fitobactérias podem sobreviver em baixas populações, com sua multiplicação paralisada, sendo que a contaminação pode ocorrer tanto no período de maturação da semente (através de respingos de chuva, água de irrigação, vento, insetos), quanto durante operações de colheita (transporte, beneficiamento, armazenamento) (BRASIL, 2009).

Na maioria das vezes a semente contaminada não apresenta sintomas ou sinais. Sua associação pode ocorrer externamente ou internamente e estruturas anatômicas (ex. funículo), rachaduras ou ferimentos na semente podem favorecer sua penetração, estabelecimento e multiplicação da fitobactéria no lote (BRASIL, 2009). Entre as doenças bacterianas que causam perdas à cultura do milho, a mancha branca do milho, causada por *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001), a estria bacteriana do milho, causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (LANG et al., 2017), e a podridão do colmo, causada por *Dickeya zae* (SAMSON et al., 2005), já foram detectadas em sementes de milho.

A qualidade sanitária das sementes pode ser comprovada pelo uso de meios de cultura que ofereçam alta sensibilidade, confiabilidade e rapidez dos resultados (VIOLATTI; TEBALDI, 2016). Os meios de cultura (Apêndice 1) são soluções que fornecem nutrientes para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos fora do seu habitat natural (FERNANDEZ, 1993). Existem diferentes meios de cultura semi-seletivos, estes têm como finalidade permitir o crescimento da bactéria alvo em detrimento de contaminantes (SPRADLIN, 1990; MEHTA; BOMFETI; BOLOGNINI, 2005; LOPES et al., 2008; VIOLATTI; TEBALDI, 2016; MAMEDE; TEBALDI, 2020; TEBALDI et al., 2010, 2022).

Os principais critérios de avaliação do meio semi-seletivo são sua seletividade e eficiência na detecção do patógeno, (NETO; COSTA, 2010; MSOGOYA et al., 2012; COSTA et al., 2015). *Pantoea ananatis* (MAMEDE et al., 2018; MAMEDE; TEBALDI, 2020) e *X. vasicola* pv. *vasculorum* (ARIAS et al., 2020; TEBALDI et al., 2022) já foram detectadas em sementes de milho com o uso de meios de cultura semi-seletivos. Em vista disso, os objetivos com este trabalho são: (i) avaliar o uso de meio de culturas semi-seletivos para a detecção simultânea de *D. zea*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*, e (ii) avaliar a sobrevivência das bactérias em sementes de milho inoculadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia.

1 Preparo da suspensão bacteriana

Os isolados bacterianos UFU A18, de *P. ananatis*, UFU J29, de *X. vasicola* pv. *vasculorum* e UFU M58, de *D. zea*, pertencentes à coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da UFU foram recuperados e multiplicados em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24-48 horas a 28 °C.

A suspensão bacteriana foi preparada em água filtrada esterilizada, ajustada em espectrofotômetro para $OD_{550}=0,1$ correspondendo aproximadamente a 1×10^{12} UFC mL⁻¹ para *P. ananatis*, 1×10^8 UFC mL⁻¹ para *X. vasicola* pv. *vasculorum* e 1×10^7 UFC mL⁻¹ para *D. zea*.

2 Avaliação da supressividade e repressividade dos meios de cultura

Para avaliação individual de cada isolado, o experimento consistiu num delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições, onde os tratamentos foram compostos por seis meios de cultura, acrescidos de ciclohexamida. Conforme Tópico 1.1, a suspensão bacteriana foi calibrada e realizou-se diluição em série (10^{-1} a 10^{-10} para *P. ananatis*, 10^{-1} a 10^{-7} para *X. vasicola* pv. *vasculorum* e 10^{-1} a 10^{-6} para *D. zea*). Em seguida, cada suspensão foi semeada (100 µL) sobre seis meios de cultura: 523, TSA, YDC, NA, PSA e XTS (Apêndice 1), com adição do fungicida ciclohexamida na dosagem de 0,005 mg mL⁻¹ (SAUER et al., 2010).

Para detecção simultânea das três bactérias em meio de cultura foi avaliada a mistura dos isolados. O experimento consistiu num esquema fatorial duplo (6x3), com quatro repetições, onde os

tratamentos foram compostos por seis meios de cultura, acrescidos de ciclohexamida, e 3 bactérias. Com as suspensões calibradas conforme Tópico 1.1, a suspensão de *P. ananatis* (OD₅₅₀ 0,1) foi diluída (10^{-2}) devido ao seu crescimento rápido. Em seguida, em eppendorf autoclavado preparou-se 900 µL de suspensão bacteriana contendo 300 µL de *P. ananatis* + 300 µL de *X. vasicola* pv. *vasculorum* + 300 µL de *D. zeaе*. Realizou-se diluição em série (10^{-1} a 10^{-6}) e a suspensão bacteriana foi semeada (100 µL) sobre os meios de cultura citados.

Para ambos os ensaios, as placas foram incubadas em BOD a 28 °C por quatro dias. A eficiência de cada meio de cultura foi determinada a partir do diâmetro das colônias em milímetros (mm) e contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹).

3 Inoculação de sementes de milho

Sementes não tratadas da cultivar de milho híbrido P1630H foram inicialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min, lavadas em água corrente e secas sobre papel filtro autoclavado em câmara de fluxo laminar.

Em seguida, três amostras de 210 g (700 sementes) foram inoculadas com *P. ananatis*, *X. vasicola* pv. *vasculorum* e *D. zeaе*. As sementes foram imersas em 420 mL de suspensão bacteriana a 10^{10} UFC mL⁻¹ para *P. ananatis*, 10^8 UFC mL⁻¹ para *X. vasicola* pv. *vasculorum* e 10^9 UFC mL⁻¹ para *D. zeaе*. As sementes foram mantidas imersas por 24h em geladeira e posteriormente, o excesso de líquido foi descartado e as sementes secas sobre papel filtro esterilizado, em câmara de fluxo laminar.

As sementes foram armazenadas em frasco esterilizado e permaneceram em geladeira (8°C e UR%≈30) até 3, 30, 60, 90 e 120 dias após a inoculação para então serem plaqueadas nos meios de cultura. Para confirmar a desinfestação e a inoculação, as sementes foram depositadas sobre os meios 523, XTS e TSA e após 4 dias verificou-se o crescimento bacteriano.

4 Sobrevivência e detecção em sementes de milho

Para avaliação da sobrevivência e detecção das bactérias nas sementes inoculadas, foi realizado ensaio em esquema fatorial 3 x 5 (3 meios de cultura x 5 períodos de armazenamento) em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições cada.

Conforme inoculação artificial das sementes descrita no Tópico 1.3, para cada bactéria eram plaqueadas 10 sementes por placa diretamente sobre os meios de cultura 523, TSA e XTS, com adição

do fungicida ciclohexamida (MAMEDE 2018) na dosagem de 0,005 mg mL⁻¹ (SAUER et al., 2010), nos períodos de armazenamento (5, 30, 60, 90 e 120 dias após a inoculação).

As placas foram incubadas a 28 °C por 4 dias. Após este período, avaliou-se o número de sementes com a presença de *D. zea*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*, determinando o número de sementes contaminadas.

5 Análise estatística

Para supressividade e repressividade dos meios de cultura, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o software R (R CORE TEAM, 2020). Para o Tópico 1.4 os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% e utilizando o software R (R CORE TEAM, 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Supressividade e repressividade dos meios de cultura

Houve diferença significativa entre os meios de cultura (XTS, TSA, YDC, NA, 523 e PSA) quatro dias após a incubação, para o diâmetro das colônias (Tabela 2.1) e para o número de UFC mL⁻¹ (Tabela 2.2) entre os isolados de *D. zea*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*. Observa-se que a composição de cada meio de cultura foi adequados para o crescimento, desenvolvimento e multiplicação das bactérias, divergindo apenas nas características culturais como descrito por Mehta et al. (2005). As colônias de *D. zea* apresentaram a cor branca, enquanto *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum* apresentaram a cor amarela nos diferentes meios de cultura (Figura 2.1).

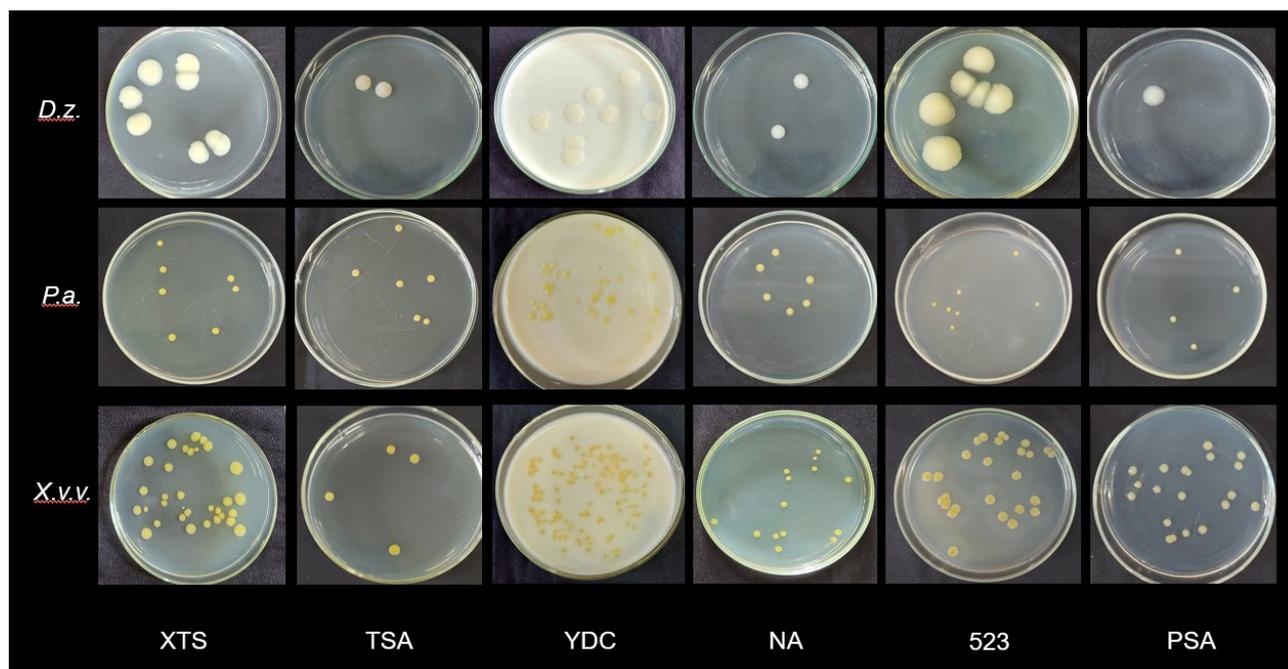


Figura 2.1. Colônias de *D. zeae* (D.z.), *P. ananatis* (P.a.) e *X. vasicola* pv. *vasculorum* (X.v.v.), nos meios XTS, TSA, YDC, NA, 523 e PSA, com adição de ciclohexamida.

Tabela 2.1. Diâmetro (mm) de colônias de *D. zeae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum* em diferentes meios de cultura.

Meio de cultura	<i>D. zeae</i>	<i>P. ananatis</i>	<i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>
523	14,67 a	3,50 b	2,00 b
NA	7,67 a	1,63 c	3,00 a
PSA	8,00 a	3,25 b	2,25 b
TSA	6,00 a	3,00 b	3,00 a
XTS	11,17 a	4,25 a	2,88 a
YDC	12,00 a	4,00 a	3,00 a

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Tabela 2.2. Número de unidades formadora de colônias (UFC mL⁻¹) de *D. zeae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum* em diferentes meios de cultura.

Meios de cultura	<i>D. zeae</i>	<i>P. ananatis</i>	<i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>
523	4,00 x 10 ⁷ b	3,75 x 10 ¹² a	4,42 x 10 ⁸ b
NA	2,00 x 10 ⁷ b	3,63 x 10 ¹² a	10,03 x 10 ⁸ b

PSA	1,67 x 10 ⁷ b	2,75 x 10 ¹² b	2,92 x 10 ⁸ b
TSA	2,00 x 10 ⁷ b	2,15 x 10 ¹² b	2,75 x 10 ⁸ b
XTS	6,67 x 10 ⁷ a	4,47 x 10 ¹² a	11,0 x 10 ⁸ b
YDC	9,33 x 10 ⁷ a	2,25 x 10 ¹² b	55,3 x 10 ⁸ a

Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Scott-Knott a 5%.

O diâmetro das colônias de *D. zea*, nos seis meios de cultura, foi semelhante, variando de 6 a 14,67 mm (Tabela 2.1). Apesar disso, o número de UFC mL⁻¹ apresentou maiores médias nos meios de cultura YDC (9,33 x 10⁷) e XTS (6,67 x 10⁷) (Tabela 2.2). As colônias apresentaram crescimento rápido, tornando-se visíveis sobre os diferentes meios de cultura em um dia de incubação a 28 °C (Figura 2.1), e em dois dias as colônias apresentaram a forma circular ou amebóide de bordas onduladas, de 2 a 3 mm de diâmetro, opacas, de coloração bege-creme clara, de acordo com o descrito por Takatsu (2007).

O isolado de *P. ananatis* nos meios XTS (4,25mm) e YDC (4 mm) apresentaram maior média de diâmetro das colônias (Tabela 2.1), diferindo significativamente dos demais meios e, também, para o meio XTS (4,47 x 10¹²) maior média no número de UFC mL⁻¹, seguido de 523 (3,75 x 10¹²) e NA (3,63 x 10¹²) (Tabela 2.2). Quanto ao isolado de *X. vasicola* pv. *vasculorum*, os meios NA, TSA, XTS e YDC apresentaram a maior média de diâmetro de colônias (3 mm) (Tabela 2.1), sendo que a maior média no número de UFC mL⁻¹ foi apresentado pelo meio YDC (55,3 x 10⁸) (Tabela 2.2).

Dickeya zea (SAMSON et al., 2005) (Sin: *Erwinia chrysanthemi* pv. *zea*), identificada no Brasil por Reifschneider e Lopes (1982), é a bactéria causadora da podridão bacteriana do milho. É uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa, baciliforme e móvel. Tem crescimento ótimo entre 28-30°C, formando colônias circulares ou amebóides, com aproximadamente 1,5 a 3,0 µm de diâmetro, pigmentadas de coloração creme, opacas em meio YDC e viscosas e brilhantes no meio King's B (WALDEE, 1942; JABUONSKI; TAKATSU; REIFSCHNEIDER, 1986; HAUBEN et al., 1998; SAMSON et al., 2005; KUMAR; HUNJAN; SINGH, 2015; KUMAR et al., 2016). A transmissão da doença por sementes e solo já foi relatada nos EUA, Brasil, Japão, Índia, Paquistão, Coreia, China, México, Indonésia e Sérvia (REIFSCHNEIDER; LOPES, 1982; THIND; PAYAK, 1985; SAH, 1991; MYUNG et al., 2010; MARTINEZ-CISNEROS et al., 2014; GUAN et al., 2019; PROKIĆ et al., 2020; SURIANI et al., 2021; YANG et al., 2021).

Pantoea ananatis (sin. *Erwinia ananas*), agente causal da mancha branca do milho (MBM), foi isolada e identificada por Paccola-Meirelles et al. (2001), é uma bactéria gram-negativa, não

capsulada, não esporulante, anaeróbia facultativa com colônias arredondadas, mucoides de coloração amarela. A bactéria já foi detectada em sementes de milho nos meios de cultura 523 e TSA, com diâmetros de colônias e UFC mL⁻¹ de 2,90 mm / 4,5 x 10⁹ e 3,10 mm / 5,2 x 10⁹, respectivamente (MAMEDE et al., 2018).

Descrita como *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* em 1978 (YOUNG et al., 1978) e reclassificada como *X. vasicola* pv. *vasculorum* (KARAMURA et al., 2015), agente causal da estria bacteriana do milho, a doença foi recentemente confirmada no Brasil (SAGATA et al., 2018; LEITE et al., 2019). A bactéria tem formato de bastonete, gram-negativa, não-fluorescente e não fermentativa com colônias mucóides, convexa de coloração amarela brilhante (LEITE JR et al., 2018).

Buscar a detecção simultânea das bactérias (*D. zeae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*) em sementes de milho, sem afetar seu desenvolvimento, traz economia de recursos e agilidade na liberação de laudos em laboratório. No crescimento simultâneo dos três isolados bacterianos (Figura 2.2) houve interação significativa para o diâmetro das colônias (Tabela 2.3) e para o número de UFC mL⁻¹ (Tabela 2.4) quatro dias após a incubação.

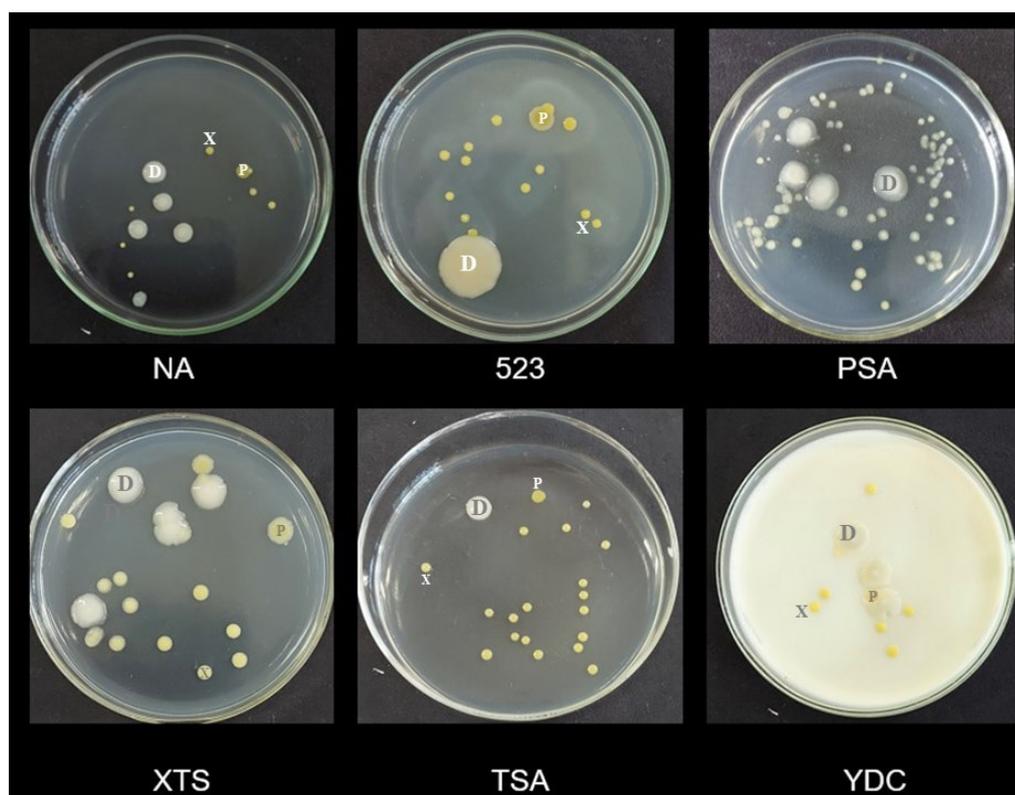


Figura 2.2. Detecção simultânea de *D. zeae* (D), *P. ananatis* (P) e *X. vasicola* pv. *vasculorum* (X), nos meios de cultura NA, 523, PSA XTS, TSA e YDC, com adição de ciclohexamida.

Tabela 2.3. Diâmetro (mm) das colônias de *D. zea*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vascolorum* detectadas simultaneamente nos meios de cultura.

Meios de cultura	<i>D. zea</i>	<i>P. ananatis</i>	<i>X. vasicola</i> pv. <i>vascolorum</i>
523	12,67 Aa	4,00 Bc	1,33 Cb
NA	7,33 Ad	3,00 Bc	1,00 Cb
PSA	11,33 Ab	3,67 Bc	1,67 Cb
TSA	7,33 Ad	4,00 Bc	2,33 Ca
XTS	9,00 Ac	5,33 Bb	3,00 Ca
YDC	9,00 Ac	7,00 Ba	2,33 Ca

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Tabela 2.4. Número de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) de *D. zea*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vascolorum* detectadas simultaneamente nos diferentes meios de cultura.

Meios de Cultura	Bactéria		
	<i>D. zea</i>	<i>P. ananatis</i>	<i>X. vasicola</i> pv. <i>vascolorum</i>
523	2,67x10 ⁷ Ba	766,67 x10 ⁷ Aa	144,67 x10 ⁷ Ba
NA	3,33 x10 ⁷ Ba	666,67 x10 ⁷ Aa	117,67 x10 ⁷ Ba
PSA	3,00 x10 ⁷ Ba	333,33 x10 ⁷ Ab	81,00 x10 ⁷ Ba
TSA	2,67 x10 ⁷ Aa	100,00 x10 ⁷ Ac	12,67 x10 ⁷ Aa
XTS	5,00 x10 ⁷ Aa	133,33 x10 ⁷ Ac	9,33 x10 ⁷ Aa
YDC	3,00 x10 ⁷ Ba	366,67 x10 ⁷ Ab	9,00 x10 ⁷ Ba

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Dickeya zea apresentou colônias circulares de coloração creme, opacas, com margem irregular; *P. ananatis*, colônias circulares amarelas (aspecto ovo frito), sem elevação, com margem ondulada, e *X. vasicola* pv. *vascolorum*, colônias circulares amarelas brilhantes, convexas, com margem lisa (Figura 2.2).

Em relação ao diâmetro, os isolados se desenvolveram de forma distinta entre os meios de cultura avaliados. O isolado de *D. zea* se destacou dos demais com o maiores diâmetros em todos os meios de cultura avaliados, com a maior média de diâmetro de colônia (12,67 mm) para o meio de

cultura 523. Para o isolado de *P. ananatis*, o meio de cultura YDC obteve a maior média de diâmetro de colônia (7 mm) em relação aos demais. Já para o isolado de *X. vasicola* pv. *vasculatorum*, as maiores médias de diâmetro de colônias foram observadas nos meios XTS (3 mm), TSA e YDC (2,33 mm).

Na detecção simultânea das bactérias é importante que todos os isolados se desenvolvam no mesmo meio de cultura com o número de UFC mL⁻¹ semelhante (Tabela 2.4). Nos meios de cultura 523, TSA e XTS, respectivamente, *D. zea* (2,67; 2,67 e 5,00x10⁷), *P. ananatis* (766,67; 100,00 e 133,33x10⁷) e *X. vasicola* pv. *vasculatorum* (144,67; 12,67 e 9,33x10⁷) alcançaram altos valores para o número de UFC mL⁻¹ e puderam ser identificados sem dificuldade.

Já para os meios NA, PSA e YDC, apesar das médias para o número de UFC mL⁻¹ se assemelharem dentro de cada bactéria, *D. zea* (3,33 e 3,00x10⁷), *P. ananatis* (666,67; 333,33 e 366,67x10⁷) e *X. vasicola* pv. *vasculatorum* (117,67; 81,00 e 9x10⁷) houve dificuldade na identificação das bactérias devido a redução do diâmetro e alteração de algumas características culturais. Para o isolado de *D. zea* a coloração de suas colônias no meio YDC dificultou sua identificação e para os isolados de *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculatorum* as colônias reduziram seu tamanho e apresentaram características muito semelhantes (cor e forma).

Sobrevivência e detecção da bactéria em sementes de milho armazenadas

O crescimento bacteriano foi verificado 4 dias após a inoculação das sementes. Com o aparecimento das colônias em volta das sementes plaqueadas nos diferentes meios de cultura foi possível confirmar sua inoculação e, nas sementes desinfestadas não houve crescimento (Figura 2.3).

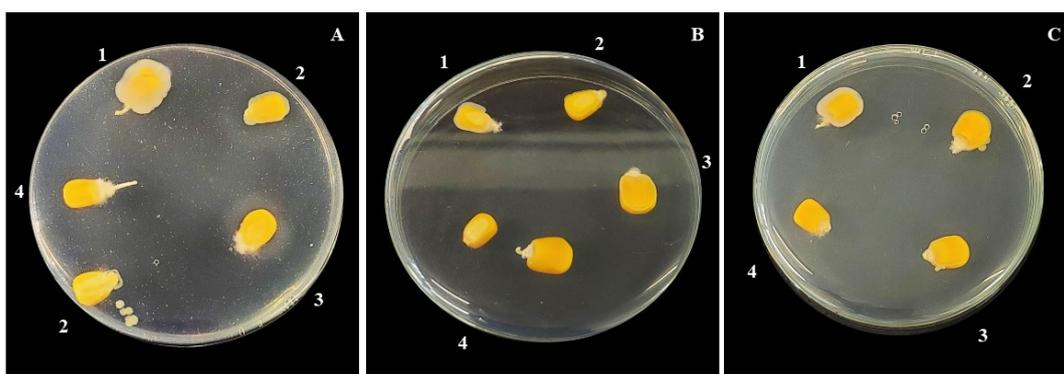


Figura 2.3. Inoculação de sementes de milho. (A) Meio 523 (B) Meio XTS (C) Meio TSA. Sementes com presença de *D. zea* (1), *P. ananatis* (2), *X. vasicola* pv. *vasculatorum* (3) e não inoculada (4).

Não houve diferença significativa entre os meios de cultura avaliados para o número de sementes contaminadas com *D. zea*. Em contrapartida, para as sementes inoculadas com *P. ananatis* houve diferença significativa entre os meios de cultura avaliados (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Número (n) de sementes inoculadas com *D. zea* e *P. ananatis* nos diferentes meios de cultura.

Meios de cultura	Sementes contaminadas (n)	
	<i>D. zea</i> ^{ns}	<i>P. ananatis</i> *
523	2,15ns	1,90b
TSA	2,30ns	3,75a
XTS	2,25ns	4,20a

^{ns} não significativo pelo teste F ao nível de 5% de significância.

* médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para o isolado de *P. ananatis*, os meios de cultura influenciaram na determinação do número de sementes contaminadas. Nos meios de cultura XTS (4,20) e TSA (3,75) houve maior detecção da bactéria. Meios de cultura são classificados de acordo com sua composição e quantidade de macro e micronutrientes (ROMEIRO, 2014). Sendo que aqueles que suportam bem o crescimento de determinadas fitobactérias possuem em sua composição elementos metabolizáveis que auxiliam na sua multiplicação (MADIGAN, 2009). Resultados semelhantes foram encontrados por MAMEDE et al. (2018) que detectaram *P. ananatis* em sementes de milho nos meios de cultura 523 e TSA.

Em relação ao tempo de armazenamento, o modelo de regressão quadrático foi eficiente em encontrar associações entre os tempos de armazenamento avaliados (5, 30, 60, 90 e 120 dias) e o número de sementes contaminadas (n) para *D. zea* (Figura 2.4) e *P. ananatis* (Figura 2.5).

O número de sementes contaminadas (eixo Y) corresponde a amostras de 10 sementes por repetição, conforme a equação, após cinco dias de armazenamento de 10 sementes inoculadas com *D. zea*, a bactéria será detectada em sete sementes (Figura 2.4). O coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,95 indica que 95% da variação no número de sementes contaminadas é explicado pela variação em dias, do tempo de armazenamento (MARTINS, 2018).

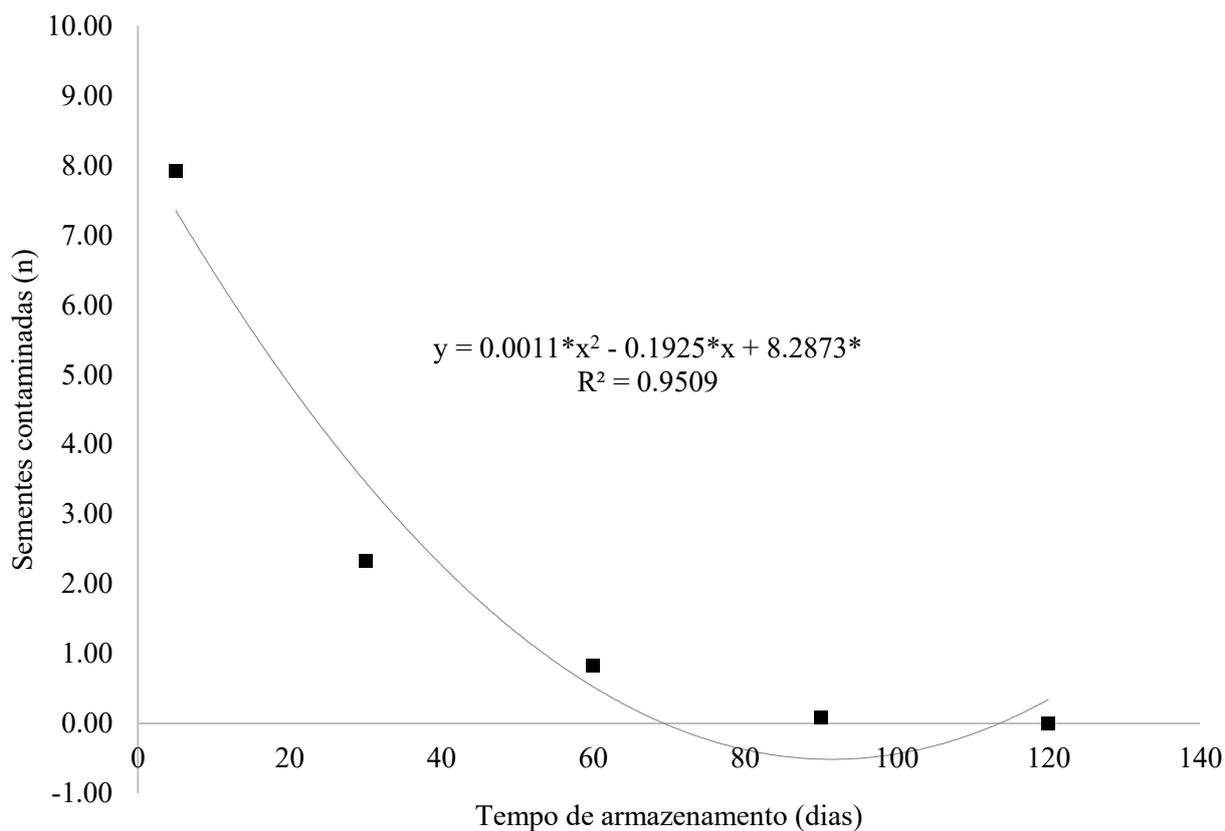


Figura 2.4. Equação de regressão em função do tempo de armazenamento das sementes de milho inoculadas com *D. zea*.

Para *P. ananatis*, conforme a equação, após cinco dias de armazenamento de 10 sementes inoculadas, a bactéria será detectada em oito sementes (Figura 2.5). O coeficiente de determinação (R^2) de 0,91 indica que 91% da variação no número de sementes contaminadas é explicada pela variação em dias no tempo de armazenamento (MARTINS, 2018).

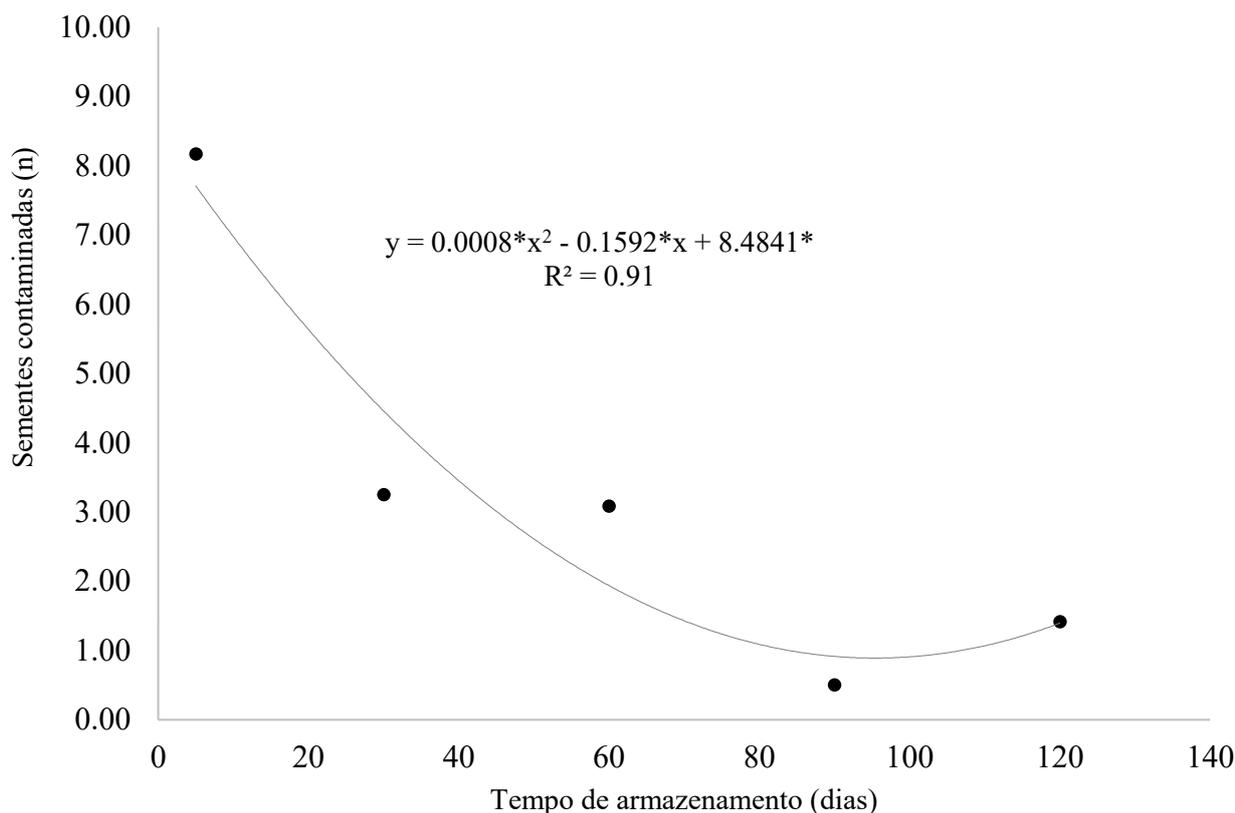


Figura 2.5. Equação de regressão em função do tempo de armazenamento das sementes de milho inoculadas com *P. ananatis*.

De acordo com os resultados, quanto maior o tempo de armazenamento, menor a sobrevivência de *D. zea* e *P. ananatis* na semente. O que pode ser explicado devido ao processo de inoculação que contamina a semente superficialmente (externamente) deixando a bactéria exposta e desprotegida.

Para o isolado de *X. vasicola* pv. *vasculorum* houve interação significativa entre os meios de cultura e os tempos de armazenamento (Tabela 2.6). Constatou-se um comportamento diferencial entre os meios de cultura em função do tempo de armazenamento ou seja, o número de sementes contaminadas diferiu entre os meios 523, TSA e XTS. E devido ao crescimento de contaminantes nos períodos de 30, 60 e 90 dias não foi possível a identificação da bactéria (Figura 2.6).

Tabela 2.6. Número (n) de sementes de milho inoculadas com *X. vasicola* pv. *vasculorum* nos diferentes meios de cultura e tempos de armazenamento.

Meios de cultura	Tempo de armazenamento (dias)
------------------	-------------------------------

	5*	30 ^{ns}	60 ^{ns}	90 ^{ns}	120*
523	1,00 b	0,00	0,00	0,50	1,00 b
TSA	4,25 a	0,00	0,50	0,00	2,75 a
XTS	1,50 b	0,00	0,00	0,00	0,25 b

^{ns} não significativo pelo teste F ao nível de 5% de significância.

* médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

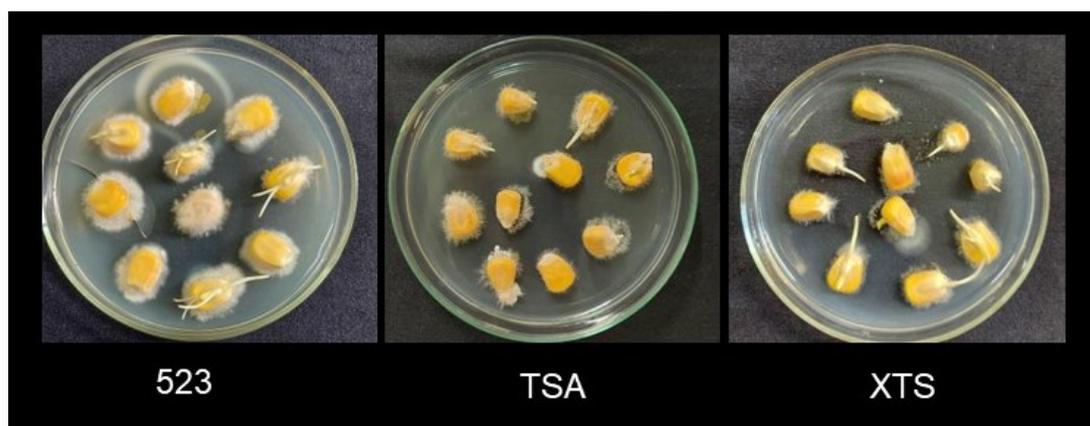
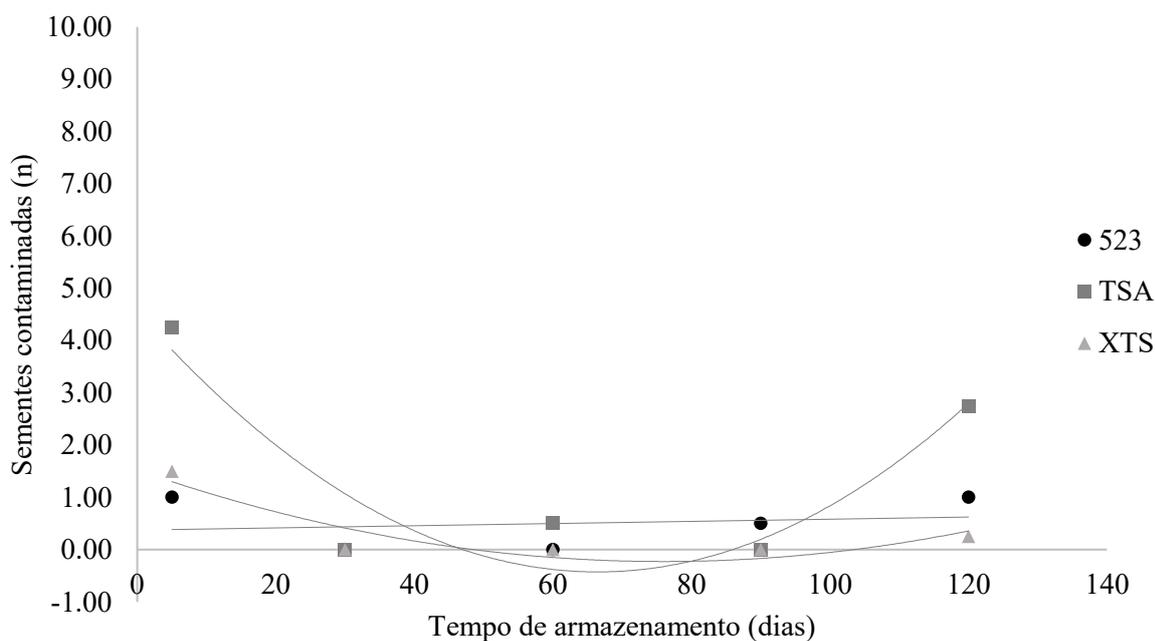


Figura 2.6. Presença de contaminantes entre 30 e 90 dias após a inoculação com *X. vasicola* pv. *vasculorum* nos meios de cultura 523, TSA e XTS, com adição de ciclohexamida.

Na Figura 2.7 observa-se as equações de regressão para os três meios de cultura 523, TSA e XTS, das sementes contaminadas com *X. vasicola* pv. *vasculorum* em função do tempo de armazenamento das sementes. Observa-se que mesmo com adição do fungicida ciclohexamida em todos os meios, o meio TSA apresentou um desempenho vantajoso. O maior número de sementes contaminadas foi detectado neste meio, com 4,25 sementes aos 5 dias e 2,75 aos 120 dias. Além da rapidez e facilidade em observar as colônias de *X. vasicola* pv. *vasculorum*, o meio também inibiu o crescimento de microrganismos saprófitos mesmo após 120 dias.



Meio de cultura	Equação do modelo	R ²
523	$Y = 0,0021^{ns}x + 0,3732$	0,0364
TSA	$Y = 0,00118x^2 - 0,1495*x + 4,5408^*$	0,8537
XTS	$Y = 0,00038x^2 - 0,0461*x + 1,5223^*$	0,8390

Figura 2.7. Equações de regressão em função do tempo de armazenamento das sementes de milho inoculadas com *X. vasicola pv. vasculatorum*.

Para o meio de cultura 523 o ajuste do modelo linear não foi significativo e não houve diferença na sensibilidade de detecção da bactéria entre os tempos de armazenamento avaliados. Ou seja, o meio não foi eficiente em determinar variações no número de sementes contaminadas por *X. vasicola pv. vasculatorum* com o passar do tempo.

Sabe-se que, com o passar do tempo, é natural que o número de sementes contaminadas reduza e, em trabalhos anteriores, a presença de *X. vasicola pv. vasculatorum* em sementes de milho foi detectada até 60 dias após a inoculação (MARTINS, 2021). Ao observar os meios de cultura TSA e XTS, para o meio TSA, após cinco dias de armazenamento, de dez sementes contaminadas com *X. vasicola pv. vasculatorum*, detectou-se a bactéria em quatro sementes e mesmo após 120 dias da inoculação o meio apresentou melhor desempenho, com maior porcentagem de detecção da bactéria e maior sensibilidade. Enquanto para o meio XTS, somente uma semente foi detectada mesmo com ambas equações apresentando coeficiente de determinação satisfatório (0,85 e 0,83).

Entre os fatores que causam perdas no sistema produtivo do milho está a sanidade das sementes (BORSATTI et al., 2021). Garantir a maior qualidade da semente é garantir maior rendimento da cultura de forma segura, pois a semente é um veículo para distribuição e disseminação de patógenos (RAAD et al., 2022). A semente auxilia na sobrevivência e disseminação de patógenos a longas distâncias, apresentando potencial de abrigo e veículo de disseminação de microrganismos que, ao continuar seu ciclo biológico após a semeadura podem reduzir a expressão do potencial genético, diminuir o estabelecimento de plântulas e levar ao surto de doenças no campo (NASCIMENTO, 2011).

A concentração de patógenos no lote de sementes é variável e muitas vezes inferior ao necessário para ser detectado (STEILMANN et al., 2019). Conhecer a capacidade de sobrevivência e longevidade de patógenos que possam ser transmitidos por sementes é aspecto primordial para a manutenção da qualidade da semente obtida no campo até a próxima semeadura.

Avaliações da sanidade evitam a ocorrência de epidemias e asseguram a comercialização de sementes já que dependendo do gênero, espécie e condições ambientais, a fitobactéria associada a determinada doença pode, a partir de uma baixa porcentual de contaminação proveniente do campo, aumentar sua população na semente mesmo após a colheita (BRASIL, 2009). Meios de cultura semi-seletivos são alternativa promissora em análise de rotina pois permitem a recuperação e identificação de populações bacterianas em sementes a curto prazo (VALENTINI; GUIDOLIN, 2010) além de evitar o crescimento de contaminantes a partir da adição de fungicidas, como o ciclohexamida, já que a maioria das sementes, mesmo após a desinfestação podem apresentar alta incidência de fungos (GALLI et al., 2005; RAMOS et al., 2014; CARDOSO et al., 2021).

CONCLUSÕES

Os meios de cultura 523, TSA e XTS com adição de ciclohexamida podem ser recomendados para a detecção simultânea de *D. zaeae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*.

As bactérias sobrevivem nas sementes e podem ser detectadas até 120 dias após o armazenamento.

Há diferença na sensibilidade dos meios de cultura para a detecção de *P. ananatis* e *X. v. pv. vasculorum* nos períodos de armazenamento avaliados. E, entre os meios, o meio TSA é o mais indicado com melhor desempenho e maior sensibilidade.

REFERÊNCIAS

ALVERENGA, G. *et al.* Sementes de milho tratada: substratos e metodologia alternativa para o teste de germinação. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 6, p. 41190–41210, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-600>. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/12312/10317>. Acesso em: 14 jun. 2023.

ARIAS, S. L. *et al.* Occurrence in Seeds and Potential Seed Transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Maize in the United States. **Phytopathology**[®], [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1139–1146, march. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-19-0306-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-08-19-0306-R#>. Acesso em 15 jun 2023.

BORSATTI, J. *et al.* Sanidade de diferentes cultivares de sementes de milho. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 196–203, 17 set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.012.0020>. Disponível em: <https://www.sustenere.co/index.php/rica/article/view/6311>. Acesso em 19 jun. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes>. Acesso em 30 mai. 2023.

CARDOSO, A. A. R.; MARTINS, W. S.; MIRANDA, F. F. R. DE. Transmissibilidade do *Fusarium moniliforme* em sementes de milho sob diferentes períodos de exposição. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 269–273, 1 ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v9n3.cardoso>. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/JBB/article/view/11435>. Acesso em 19 jun. 2023.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Boletim da safra de grãos**: 3º levantamento: safra 2020/2021. Brasília, DF, 2021. Portal. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em 19 jun. 2023.

COSTA, J. F.; ATROCH, E. M. A. C.; NAGAO, E. O. Estudos da atividade de fungicidas para o controle do crescimento de *Trichoderma* sp em meio de cultura de micropropagação de plantas. **Diversidade Microbiana da Amazônia**, [s. l.], p. 63–68, 2015. Disponível em: https://acta.inpa.gov.br/Livro-Diversidade-Microbiana-da-Amazonia/Ambiental_CostaJS.pdf. Acesso em 19 jun. 2023.

FERNANDEZ, M. R. Manual para laboratorio de fitopatological. **Embrapa – CNPT (Documentos, 6)**, Passo Fundo, p. 1-124, 1993. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/815639/1/CNPTDOCUMENTOS6_MANUALPARALABORATORIODEFITOPATOLOGIALV200801273.pdf. Acesso em: 12 set. 2022.

FILHO, I. A. P.; BORGHI, E. Sementes de Milho: nova safra, novas cultivares e contínua a dominância dos transgênicos. **Embrapa Sete Lagoas**, Sete Lagoas, n. 1, p. 1-60, maio 2020.

GALLI, J. A.; FESSEL, S. A.; PANIZZI, R. C. Effect of *Fusarium graminearum* and infection index on germination and vigor of maize seeds. **Fitopatologia Brasileira**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 470–474, out. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000500002> . Disponível em: <https://www.scielo.br/j/fb/a/Nx8CVz8JLf8wk9FJZgmvmLL/?lang=en>. Acesso em 19 jun. 2023.

GUAN, Y. *et al.* First report of corn stalk rot caused by *Dickeya zeae* on sweet corn in Shanghai, China. **Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 557-558, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00447-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42161-019-00447-8>. Acesso em 19 jun. 2023.

HAUBEN, L. *et al.* Phylogenetic Position of Phytopathogens within the Enterobacteriaceae. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 384–397, ago. 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80048-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202098800489?via%3Dihub>. Acesso em 19 jun. 2023.

JABUONSKI, R. E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, [s. l.], v. 11, n. 1, 1986.

ONSKI, R. E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, [s. l.], v. 11, n. 1, 1986.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, California, v. 60, p. 969–976, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-969>. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Abstracts/Phyto60_969.htm. Acesso em 19 jun. 2023.

KARAMURA, G. *et al.* Comparative pathogenicity studies of the *Xanthomonas vasicola* species on maize, sugarcane and banana. **African Journal of Plant Science**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 385–400, 30 set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJPS2015.1327>. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJPS/article-abstract/2CA0D4255512>. Acesso em 19 jun. 2023.

KUMAR, A. *et al.* Evaluation of management of bacterial stalk rot of maize (*Dickeya zeae*) using some chemicals and bio-agents. **Journal of Applied and Natural Science**, Ludhiana, v. 8, n. 3, p. 1146–1151, 1 set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.31018/jans.v8i3.932>. Disponível em: <https://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/932>. Acesso em 19 jun. 2023.

KUMAR, A.; HUNJAN, M. S.; SINGH, H. K. AND P. P. Characterizing diversity of *Dickeya zeae* causing bacterial stalk rot of maize based on biochemical assays and antibiotic sensitivity. **Indian Phytopathology**, Punjab, v. 68, n. 4, p. 375-379, 2015.

LANG, J. M. *et al.* Detection and Characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. Causing Bacterial Leaf Streak of Corn in the United States. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 107, n. 11, p. 1312–1321, nov. 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0168-R> . Disponível em:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-05-17-0168-R>. Acesso em 16 jun. 2023.

LEITE JR, R. P. *et al.* Estria Bacteriana do Milho no Paraná. **Informe da Pesquisa**, Londrina, n. 160, p. 7-18, jul. 2018.

LEITE, R. P. *et al.* First Report of the Occurrence of Bacterial Leaf Streak of Corn Caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 145–145, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1100-PDN> . Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-06-18-1100-PDN>. Acesso em 17 jun. 2023.

LOPES, L. P. *et al.* Meio semi-seletivo para detectar *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e sua erradicação através do tratamento de sementes com o fungicida tolylfluanid. **Summa Phytopathologica**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 287–288, set. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000300020>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/KTShVxZPVGffPzq7ZYgWyGw/?lang=pt>. Acesso em 19 jun. 2023.

MADIGAN, M. T. **Brock biology of microorganisms**. 12. ed. San Francisco : Benjamin Cummings. 2009.

MAMEDE, M. C. *et al.* Detection of *Pantoea ananatis* in corn seeds on semi-selective medium. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 254–256, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0203-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40858-017-0203-z>. Acesso em 19 jun. 2023.

MAMEDE, M. C.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho. **Summa Phytopathologica**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 36–40, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/198561>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/zK9nfQsZpVGMK7HzwQQkFDL/?lang=pt>. Acesso em 19 jun. 2023.

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

MARTINEZ-CISNEROS, B. A. *et al.* First Report of Bacterial Stalk Rot of Maize Caused by *Dickeya zeae* in Mexico. **Plant Disease**, [s. l.], v. 98, n. 9, p. 1267–1267, 1 set. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0198-PDN>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-02-14-0198-PDN>. Acesso em 18 jun. 2023.

MARTINS, B. R. **Determinação do potencial de transmissão de Xanthomonas casicola pv. vasculorum por sementes e resíduos de milho**. 2021. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

MARTINS, M. E. G. Coeficiente de determinação. **Revista de Ciência Elementar**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1, 30 mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.24927/rce2018.024>. Disponível em: <https://rce.casadasciencias.org/rceapp/art/2018/024/>. Acesso em 20 jun. 2023.

MEHTA, Y. R.; BOMFETI, C.; BOLOGNINI, V. A Semi-Selective agar medium to detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in naturally infected cotton seed. **Fitopatologia Brasileira**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 489–496, out. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000500005>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/fb/a/nQpjPyYhVBj3fD8h3JzdZcM/?lang=en>. Acesso em 20 jun. 2023.

MSOGOYA, T. *et al.* Identification and management of microbial contaminants of banana in vitro cultures. **Journal of Applied Biosciences**, Tanzania, v. 55, p. 3987–3994, jul. 2012.

MYUNG, I.-S. *et al.* First report of bacterial stalk rot of sweet corn caused by *Dickeya zeae* in Korea. **New Disease Reports**, Goesan, v. 22, 31 dez. 2010. DOI: <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.022.015>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.5197/j.2044-0588.2010.022.015>. Acesso em 19 jun. 2023.

NASCIMENTO, W. M. **Hortaliças: tecnologia de produção de sementes**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2011.

NETO, S. P. S.; COSTA, C. J. Controle de contaminações no cultivo in vitro de pequizeiro. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2010. **Anais eletrônicos** [...]. [Natal]: 2010. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/865835>. Acesso em: 20 jun. 2023.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *et al.* Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Sete Lagoas, v. 149, n. 5, p. 275–279, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>. Acesso em 19 jun. 2023.

PERLIN, G. S. **Efeito do tempo de armazenagem na qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com inseticidas e fungicidas**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Pampa, Itaqui, 2021.

PROKIĆ, A. *et al.* Identification and characterization of *Dickeya zeae* strains associated with maize stalk soft-rot in northern Serbia. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 157, n. 3, p. 685–691, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02019-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-020-02019-4>. Acesso em 19 jun. 2023.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 07 jul. 2023.

RAAD, S. M. *et al.* Qualidade fitossanitária e germinativa de sementes de milho submetidas à termoterapia. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1–6, 20 maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i7.26749>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/26749>. Acesso em 19 jun. 2023.

RAMOS, D. P. *et al.* Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 24–31, mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1983-40632014000100011>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pat/a/VSQJTrB5B9mT5RQQmR6JD5f/?lang=pt>. Acesso em 19 jun. 2023.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; LOPES, C. A. Bacterial Top and Stalk Rot of Maize in Brazil. **Plant Disease**, [s. l.], v. 66, p. 519–520, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-66-519>. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1982Abstracts/PD_6_519.htm. Acesso em 17 jun. 2023.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. 1ª reimpressão. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: Editora UFV, 2014.

SAH, D. N. Influence of environmental factors on infection of maize (*Zea mays* L.) by *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*. **Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science**, v. 12, p. 41–45, 1991.

SALES, P. C. S. **Qualidade fisiológica e desempenho de sementes de milho tratadas com inseticidas e armazenadas**. 2021. Dissertação (Mestrado Profissional em Bioenergia e Grãos) – Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2021.

SAMSON, R. *et al.* Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 1415–1427, 1 jul. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.02791-0>. Acesso em 17 jun. 2023.

SAUER, A. V. *et al.* Sobrevivência de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho, em restos culturais de milho. *In*: CD-Rom apresentado em XXVIII Congresso Nacional de

Milho e Sorgo. **Anais eletrônicos** [...]. [Goiânia]: Associação Brasileira de Milho e Sorgo., 2010. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25233/1/0595.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2019.

SPRADLIN, J. T. An Improved Semiselective Agar Medium for *Xanthomonas campestris* Pathovar translucens. **Bios**, Laurinburg, v. 61, n. 3/4, p. 62–68, 1990.

STEILMANN, P. *et al.* DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FITOBACTÉRIAS EM SEMENTES DE TRIGO. **Nativa**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 349–355, 1 jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.31413/nativa.v7i4.6710>. Disponível em: <https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/nativa/article/view/6710>. Acesso em 19 jun. 2023.

SURIANI *et al.* The presence of bacterial stalk rot disease on corn in Indonesia: A review. IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**, Makassar, v. 911, n. 1, p. 012058, 1 nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/911/1/012058>. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/911/1/012058>. Acesso em 19 jun. 2023.

TAKATSU, A. **Taxonomia de Dickeya – um novo gênero de bactéria fitopatogênica**. 2007. RAPP—Brasília, DF: Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, 2007.

TEBALDI, N. D. *et al.* Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. **Trop. plant pathology**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 213–222, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762010000400002>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/tpp/a/Ntjpf5b7YwLw33dmVhggWgP/?lang=en>. Acesso em 19 jun. 2023.

TEBALDI, N. D. *et al.* Occurrence and detection of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in naturally contaminated maize seeds in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 698–702, 6 jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00514-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40858-022-00514-z>. Acesso em 19 jun. 2023.

THIND, B. S.; PAYAK, M. M. A review of bacterial stalk rot of maize in India. **Tropical Pest Management**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 311–316, 1 jan. 1985. DOI:

<https://doi.org/10.1080/09670878509371007>. Disponível em:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670878509371007>. Acesso em 19 jun. 2023.

VALENTINI, G.; GUIDOLIN, A. F. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: Etiologia, detecção e medidas de controle. **Biotemas**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 9, jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n4p1>. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2010v23n4p1>. Acesso em 19 jun. 2023.

VIOLATTI, M. R.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 268–270, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2127>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/CnGJB5kXzjVLH883YpRTXdG/?lang=pt>. Acesso em 19 jun. 2023.

WALDEE, E. L. **Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria**. 1942. Tese (Doutorado em Filosofia) - Iowa Stage College, [s. l.], 1942.

YANG, Y. *et al.* First Report of Stalk Bacterial Soft Rot of Sugarcane Caused by *Dickeya zeae* in China. **Plant Disease**, [s. l.], v. 105, n. 4, p. 1188–1188, 1 abr. 2021. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2234-PDN>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-20-2234-PDN>. Acesso em 19 jun. 2023.

YOUNG, J. M. *et al.* A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 153–177, fev. 1978. DOI: <https://doi.org/10.1080/00288233.1978.10427397>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00288233.1978.10427397>. Acesso em 19 jun. 2023.

CAPÍTULO 3

DETECÇÃO DE *Dickeya zae* EM SEMENTES DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADAS

RESUMO

A podridão bacteriana do milho causada por *Dickeya zae* (Sin: *Erwinia chrysanthemi* pv. *zae*) leva a grandes perdas econômicas para a cultura. Os objetivos com este trabalho são avaliar meios de cultura para a detecção de *D. zae* em sementes de milho naturalmente contaminadas. Para a detecção da bactéria foram avaliados três lotes de sementes de milho. O ensaio foi realizado em esquema fatorial 3 x 4 (meios de cultura x diluições) em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. As sementes de cada lote foram separadas em duas amostras, infestadas e desinfestadas. O extrato das sementes foi obtido através da embebição de 100 g de sementes em 200 mL de água filtrada esterilizada, incubado por 16 horas a aproximadamente 8 °C em geladeira. O extrato foi diluído em série (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e 100 µL foram cultivados, em placas de Petri, nos meios de cultura 523, TSA e XTS, com adição de ciclohexamida. As placas foram incubadas a 28 °C por 2 dias, calculando-se o número de UFC g⁻¹ de sementes. As colônias suspeitas foram repicadas e cultivadas no meio 523 e caracterizadas bioquímica e fisiologicamente pelos testes de: Gram, Oxidação/Fermentação, YDC, reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco e patogenicidade no hospedeiro. A bactéria foi detectada nos extratos das três cultivares de milho avaliadas. O meio de cultura TSA, com adição de ciclohexamida, pode ser recomendado para a detecção de *D. zae* em sementes de milho, em análise de rotina e a desinfestação prévia das sementes favoreceu a identificação dos isolados reduzindo o crescimento de contaminantes.

Palavras-chave: meio de cultura; podridão bacteriana; *Zea mays*.

ABSTRACT

Bacterial corn rot caused by *Dickeya zea* (Sin: *Erwinia chrysanthemi* pv. *zea*) leads to great economic losses for the crop. The objectives of this work are to evaluate culture media for the detection of *D. zea* in naturally contaminated corn seeds. For the detection of the bacterium, three lots of corn seeds were evaluated. The test was carried out in a 3 x 4 factorial arrangement (culture media x dilutions) in a completely randomized design with three replications. The seeds of each batch were separated into two samples, infested and disinfested. The seed extract was obtained by soaking 100 g of seeds in 200 mL of sterilized filtered water, incubated for 16 hours at approximately 8 °C in a refrigerator. The extract was serially diluted (10⁻¹, 10⁻² and 10⁻³) and 100 µL were cultivated in Petri dishes in culture media 523, TSA and XTS, with the addition of cyclohexamide. The plates were incubated at 28 °C for 2 days, calculating the number of CFU g⁻¹ of seeds. Suspected colonies were picked and cultivated in medium 523 and characterized biochemically and physiologically by tests of: Gram, Oxidation/Fermentation, YDC, hypersensitivity reaction in tobacco plants and pathogenicity in the host. The bacteria was detected in the extracts of the three maize cultivars evaluated. The TSA culture medium, with the addition of cyclohexamide, can be recommended for the detection of *D. zea* in corn seeds, in routine analysis and the previous disinfestation of the seeds favored the identification of the isolates, reducing the growth of contaminants.

Keywords: culture medium; bacterial rot; *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro país com maior produção mundial de milho (116,0 milhões de t), ficando atrás apenas de China (272,6 milhões de t) e EUA (382,9 milhões de t) (FIESP, 2022). A Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) prêve uma produção total de 125,8 milhões de toneladas de milho para a safra 2022/23 e produtividade de 6.000 Kg ha⁻¹, com aumento de 3,5% na área semeada (2337,6 mil ha) (CONAB, 2022).

O rendimento da cultura é afetado por diversos fatores, climáticos como temperatura e disponibilidade hídrica; edáficos como fertilidade, estrutura e textura do solo; manejo como densidade populacional e arranjo de plantas (GALON et al., 2010; GONG et al., 2015; ARTUZO et al., 2019). Tais fatores combinados à ocorrência simultânea de agentes bióticos como plantas daninhas, insetos-praga e doenças podem ser devastadores e reduzir drasticamente a produtividade da cultura (GALON et al., 2010).

Entre as doenças, a podridão bacteriana causada por *Dickeya zea* (SAMSON et al., 2005) (Sin: *Erwinia chrysanthemi* pv. *zea*) identificada no Brasil por Reifschneider e Lopes (1982), acarreta grandes perdas econômicas para a cultura. A bactéria infecta uma ampla variedade de plantas em todo o mundo, incluindo dicotiledôneas, como batata, tabaco, crisântemo e *Philodendron* e monocotiledôneas como milho, arroz, banana, abacaxi e braquiária (REIFSCHNEIDER; LOPES, 1982; SAMSON et al., 2005; SŁAWIAK et al., 2009; TOTH et al., 2011; ZHANG et al., 2014).

Dickeya zea é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa, baciliforme e móvel. Têm crescimento ótimo entre 28-30 °C, formando colônias circulares ou amebóides, com aproximadamente 1,5 a 3,0 mm de diâmetro, pigmentadas de coloração creme, opacas em meio YDC e viscosas e brilhantes no meio King's B (WALDEE, 1942; JABUONSKI; TAKATSU; REIFSCHNEIDER, 1986; HAUBEN et al., 1998; SAMSON et al., 2005; KUMAR; HUNJAN; SINGH, 2015; KUMAR et al., 2016).

A transmissão da bactéria por sementes e solo foi relatada nos EUA, Brasil, Japão, Índia, Paquistão, Coréia, China, México, Indonésia e Sérvia (REIFSCHNEIDER; LOPES, 1982; THIND; PAYAK, 1985; SAH, 1991; MYUNG et al., 2010; MARTINEZ-CISNEROS et al., 2014; GUAN et al., 2019; PROKIĆ et al., 2020; SURIANI et al., 2021; YANG et al., 2021). A alta temperatura é muito importante para o patógeno causar infecção e para o desenvolvimento da doença. Geralmente, *D. zea* infecta culturas cultivadas em áreas tropicais e subtropicais com chuvas intensas, onde as partes verdes são completamente molhadas, ou áreas onde a irrigação ocorre por aspersão favorecendo seu desenvolvimento (KUMAR et al., 2017).

Após a penetração, a bactéria coloniza o órgão vegetal e, devido à produção de enzimas pectinolíticas, ocorrem os sintomas de podridão-mole (GOODMAN; KIRALY; WOOD, 1986). A doença pode ocorrer em um ou em vários internódios acima da superfície do solo (KUMAR et al., 2016). Os sintomas iniciais incluem a descoloração da bainha da folha, que evolui pelo caule até as folhas. Ocorre a maceração do caule e dos entrenós basais, resultando no amolecimento e descoloração dos tecidos infectados, levando a um odor fétido e, por fim, a planta tomba, resultando em graves perdas de rendimento de grãos (KUMAR; HUNJAN; SINGH, 2015).

O uso de sementes livres do patógeno é uma das estratégias de controle da doença (AYSAN; CETINKAYA YILDIZ, 2022). Bactérias fitopatogênicas podem ser detectadas pelo uso de meios de cultura semi-seletivos com alta sensibilidade, confiabilidade e rapidez dos resultados (VIOLATTI; TEBALDI, 2016). Em sementes de milho já foram descritas a detecção de *Pantoea ananatis* (MAMEDE et al., 2018; MAMEDE; TEBALDI, 2020) e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (ARIAS et al., 2020; TEBALDI et al., 2022) com meios de cultura semi-seletivos.

A sobrevivência da bactéria em tecidos vegetais dá uma indicação da presença contínua do inóculo no campo, além disso a sobrevivência na semente também sugere a infecção em uma estação subsequente. Com isso, os objetivos com este trabalho é avaliar meios de cultura para a detecção de *D. zea* em sementes de milho naturalmente contaminadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Para a detecção de *Dickeya zea* foram avaliados três lotes de sementes de milho: Parental 1(P1), Parental 2(P2) e Milho Híbrido (MH). Produzidos em Uberlândia (MG) na safra de 2022 e colhidos de plantas que apresentavam sintomas de podridão bacteriana.

O ensaio foi realizado em esquema fatorial 3 x 4 (meios de cultura x diluições) em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. As sementes de cada cultivar foram separadas em duas amostras, infestadas e desinfestadas. Para a desinfestação das sementes, estas permaneceram por 3 min em hipoclorito de sódio a 1% e, em seguida, foram lavadas em água corrente.

O extrato das sementes foi obtido através da embebição de 100 g de sementes em 200 mL de água filtrada esterilizada, incubado por 16 horas a aproximadamente 8° C em geladeira. Posteriormente, o extrato das sementes foi diluído em série (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e 100 µL foram cultivados, em placas de Petri, nos meios de cultura 523, TSA e XTS (KADO; HESKETT, 1970;

SCHAAD; FORSTER, 1985), com adição de ciclohexamida (SAUER et al., 2010). As placas foram incubadas a 28° C por 2 dias, calculando-se o número de UFC g⁻¹ de sementes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o software R (R CORE TEAM, 2020).

As colônias suspeitas foram repicadas e cultivadas em meio 523 e caracterizadas bioquímica e fisiologicamente pelos testes de: Gram, Oxidação/Fermentação, YDC e reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco.

A patogenicidade dos isolados foi avaliada em plantas de milho cultivadas em vasos plásticos de 500 mL, contendo solo, areia e vermiculita na proporção de 3:1:1. A suspensão bacteriana foi preparada e ajustada em espectrofotômetro para OD₆₀₀=0,6 (10⁸ UFC mL⁻¹). A inoculação foi realizada pelo método da seringa quando o milho atingiu o estágio V2 a V3 (SILVA et al., 2019). As plantas foram mantidas em câmara úmida 24h antes e após a inoculação.

Os isolados obtidos foram preservados e mantidos na coleção do LABAC, o isolado UFU M58 de *D.zeae* pertencente a coleção de trabalho do LABAC foi usado como controle em todos os testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bactéria foi detectada nos extratos das três cultivares de milho avaliadas. Na Figura 3.1, a partir do cultivo do extrato de sementes na diluição 10⁻¹ foi observado a presença de colônias nas amostras infestadas de todos os lotes (MH-I, P1-I e P2-I). Já para as amostras desinfestadas (MH-D, P1-D e P2-D) apenas as amostras do MH e P1 exibiram colônias.

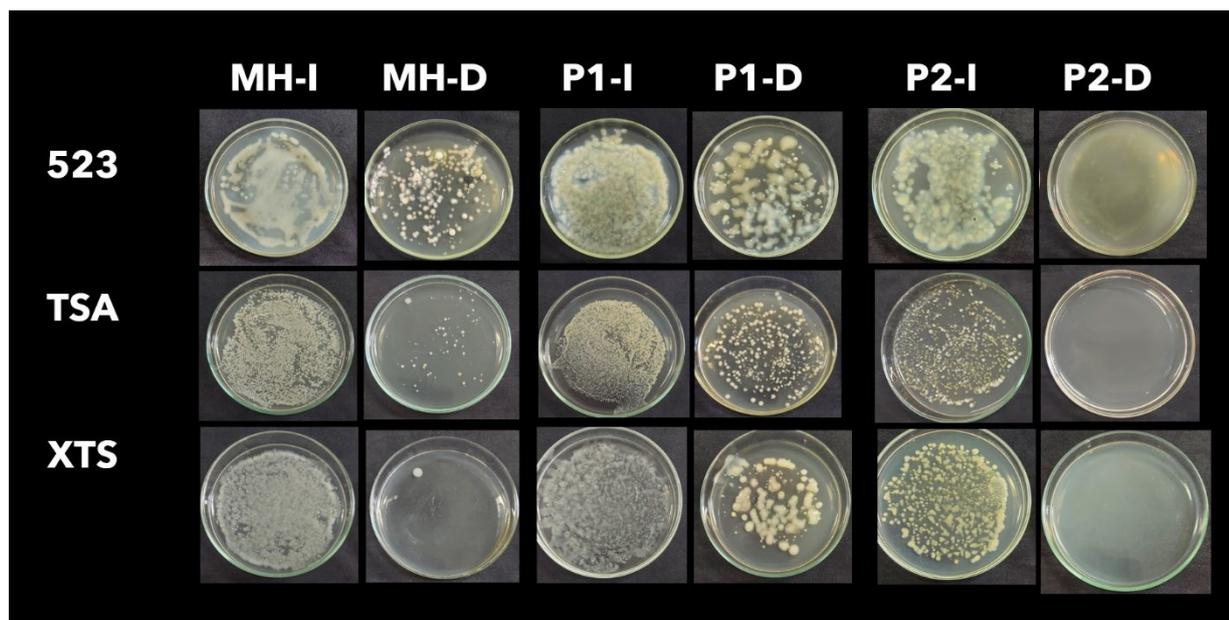


Figura 3.1. Detecção de *Dickeya zeae* em extrato de semente diluído 10^{-1} nos meios de cultura 523, TSA e XTS das amostra de sementes infestadas (I) e desinfestadas (D).

As sementes podem transportar patógenos por longas distâncias e são importantes fontes primárias de inóculo (AGARWAL; SINCLAIR, 1987; MACHADO, 1988; MAUDE, 1996). Diferentes meios de cultura seletivos e semi-seletivos já foram elaborados com a finalidade de permitir o crescimento da bactéria alvo em detrimento de contaminantes (ANILKUMAR; CHAKRAVARTI, 1971; PÉROMBELON; LUMB; HYMAN, 1987; MAMEDE; TEBALDI, 2020; TEBALDI et al., 2022).

Para a detecção de *D. zeae* em sementes de milho naturalmente infestadas, houve interação significativa entre as cultivares (MH, P1 e P2) o extrato não diluído (ND) e as diluições (10^{-1} a 10^{-3}) para os meios de cultura avaliados (523, TSA e XTS) tanto nas amostras sem (Tabela 3.1) e com (Tabela 3.2) desinfestação.

Tabela 3.1. Detecção de *Dickeya zeae* em sementes naturalmente infestadas (UFC g^{-1} de semente) sem desinfestação.

Diluições	523			TSA			XTS		
	MH*	P1	P2	MH	P1	P2	MH	P1	P2
ND	0,00Ab	0,00Ab	0,00Aa	0,00Ab	0,00Ab	0,00Aa	0,00Ab	0,00Aa	0,00Aa
10^{-1}	0,00Ab	0,00Ab	0,00Aa	0,00Ab	0,00Ab	0,00Aa	0,00Ab	0,00Aa	0,00Aa

10 ⁻²	0,00Ab	2,60Ab	1,00Aa	0,00Ab	2,87Ab	5,00Aa	0,00Ab	0,00Aa	1,07Aa
10 ⁻³	15,33Ba	33,33Aa	4,00Ca	200,67Aa	76,00Ba	6,00Ca	132,00Aa	0,00Ba	4,67Ba

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

*Todos os valores são multiplicados por 10⁴.

Tabela 3.2. Detecção de *Dickeya zae* em sementes naturalmente infestadas (UFC g de semente⁻¹) e desinfestadas.

Diluições	523			TSA			XTS		
	MH*	P1	P2	MH	P1	P2	MH	P1	P2
ND	2,27Aa	0,00Ac	0,00Aa	0,67Aa	0,00Ac	0,00Aa	2,00Aa	0,00Ab	0,00Aa
10 ⁻¹	0,67Aa	16,00Ac	0,00Aa	1,33Aa	288,00Ac	0,00Aa	0,00Aa	90,00Ab	0,00Aa
10 ⁻²	0,00Ba	500,00Ab	0,00Ba	0,00Ba	686,67Ab	0,00Ba	0,00Aa	0,00Ab	0,00Aa
10 ⁻³	0,00Ba	800,00Aa	0,00Ba	0,00Ba	1266,67Aa	0,00Ba	0,00Ba	500,00Aa	0,00Ba

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

*Todos os valores são multiplicados por 10².

Na Tabela 3.1 a detecção de *D. zae* em sementes não desinfestadas foi prejudicada nas amostras menos diluídas (ND, 10⁻¹ e 10⁻²) ou pela alta concentração de bactérias que não formavam colônias isoladas ou devido a presença de espécies contaminantes de fungos. As sementes de milho abrigam várias fungos fitopatogênicos que apresentam variações em sua diversidade e incidência, fungos como *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus flavus* são encontrados associados às sementes (BERSCH et al., 2021) e podem inibir o crescimento da bactéria alvo. Em relação aos meios de cultura, na amostra mais diluída (10⁻³) foi possível avaliar o número de UFC g⁻¹ de semente para cada cultivar. No meio 523 a amostra P1 (33,33x10⁴), no meio TSA a amostra de MH (200,67x10⁴) e no meio XTS também a amostra de MH (132,00x10⁴) apresentaram o maior número de UFC g⁻¹ de semente.

Na Tabela 3.2, a desinfestação prévia das sementes auxiliou no crescimento de colônias isoladas, facilitando a identificação de colônias suspeitas de *D. zae*. Nas amostras MH e P1 foi possível avaliar o número de UFC g⁻¹ de semente, porém na amostra P2 não houve crescimento de nenhuma colônia em nenhum meio de cultura ou diluição. Para os meios de cultura 523 e XTS, tanto no extrato não diluído da amostra MH (2,27x10²; 2,00x10²) quanto no extrato diluído 10⁻³ da amostra P2 (800,00x10²; 500,00x10²), detectou-se o maior número de UFC g⁻¹ de semente. No meio TSA o

extrato 10x diluído da amostra MH ($1,33 \times 10^2$) e o extrato 1000x diluído da amostra P1 ($1266,67 \times 10^2$) apresentaram o maior número de UFC g^{-1} de semente.

A seletividade dos meios de cultura pode ser obtida através de fontes específicas de carbono e nitrogênio, de modo que há o estímulo no crescimento de determinadas espécies e inibição de outras. A alta taxa de recuperação nos extratos de sementes avaliada para os meios 523, TSA e XTS reflete a baixa repressividade destes na detecção de *D. zea*. Resultados semelhantes foram observados na detecção de *P. ananatis* (MAMEDE; TEBALDI, 2020), *X. vasicola* pv. *vascolorum* (TEBALDI et al., 2022) e *Erwinia* sp. (CUPPELS; KELMAN, 1974; PIERCE; MCCAIN, 1992).

A identificação de bactérias pode ser feita de várias maneiras, a partir da morfologia, características bioquímicas, patológicas e moleculares (SURIANI et al., 2021). Isolados que causam a podridão do colmo no milho têm sido identificados por vários pesquisadores como *D. zea* (PROKIĆ et al., 2020; SURIANI et al., 2021; AYSAN; CETINKAYA YILDIZ, 2022), principalmente a partir de características morfológicas, bioquímicas e patológicas.

A partir da avaliação das colônias suspeitas detectadas no extrato das sementes, 7 isolados bacterianos apresentaram forma circular com borda irregular, textura lisa de aparência brilhante e coloração branca. Todos foram gram negativos, fermentação da glicose positiva e apresentaram colônias brancas em YDC. Para todos os isolados e também para o controle, o teste de hipersensibilidade em fumo foi negativo e o teste de patogenicidade no hospedeiro positivo. Os isolados obtidos foram preservados e mantidos na coleção do LABAC sob o código UFU O10, O11, O12, O13, O14, O15 e O16.

CONCLUSÕES

Dickeya zea foi detectada nos três lotes de sementes.

O meio de cultura TSA, com adição de ciclohexamida pode ser recomendados para detecção de *D. zea* em sementes de milho, em análise de rotina.

A desinfestação prévia das sementes favorece a identificação dos isolados e reduz o crescimento de contaminantes.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of Seed Pathology**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1987.

ANIL KUMAR, T. B.; CHAKRAVARTI, B. B. Survival of *Pseudomonas lapsa* and *Erwinia carotovora*, Stalk Rot Pathogens of Maize in Seed and a medium for isolation and detection of *Erwinia carotovora* in soil. **Proceedings of Indian Nacional Science Academiyy, Section B**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 322–325, 1971.

ARIAS, S. L. *et al.* Occurrence in Seeds and Potential Seed Transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Maize in the United States. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1139–1146, march. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-19-0306-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-08-19-0306-R#>. Acesso em 15 jun. 2023.

ARTUZO, F. D. *et al.* O potencial produtivo brasileiro: uma análise histórica da produção de milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 12, n. 2, p. 515, 14 maio 2019. DOI: <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2019v12n2p515-540>. Disponível em: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/rama/article/view/5327>. Acesso em 21 jun. 2023.

AYSAN, Y.; CETİNKAYA YİLDİZ, R. A new bacterial disease of maize (*Zea mays*) in the Eastern Mediterranean Region: bacterial stalk rot disease caused by *Dickeya zeae*. **M. K. Ü. Journal of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 493–501, 1 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.37908/mkutbd.1119953>. Disponível em: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/mkutbd/issue/73156/1119953>. Acesso em 21 jun. 2023.

BERSCH, I. da R. *et al.* Sementes de milho doce tratadas: substratos para o teste de germinação e sanidade. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 13, p. e363101320931–e363101320931, 16 out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.20931>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/20931>. Acesso em 21 jun. 2023.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Boletim da safra de grãos: 3º levantamento: safra 2020/2021**. Brasília, DF, 2021. Portal. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em 19 jun. 2023.

CUPPELS, D.; KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. **Phytopathology**, Madison, v. 64, p. 468–475, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-64-468>. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1974Abstracts/Phyto64_468.htm. Acesso em 21 jun. 2023.

Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP). **Safra Mundial de Milho 2022/23** – 8º levantamento do USDA, São Paulo, dez. 2022. Disponível em: <https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/file-20221213172618-boletimmilhodezembro2022/>. Acesso em 15 jun. 2023.

GALON, L. *et al.* Influência dos fatores abióticos na produtividade da cultura do milho. **Revista Trópica: Ciências Agrárias E Biológicas**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 1–21, 2010. DOI: <https://doi.org/10.0000/rtcab.v4i3.307>. Disponível em: <http://periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/307>. Acesso em 21 jun. 2023.

GONG, F. *et al.* Making better maize plants for sustainable grain production in a changing climate. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 6, p. 1-6, out. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00835>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00835/full>. Acesso em 21 jun. 2023.

GOODMAN, R. N.; KIRALY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986.

GUAN, Y. *et al.* First report of corn stalk rot caused by *Dickeya zeae* on sweet corn in Shanghai, China. **Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 557-558, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00447-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42161-019-00447-8>. Acesso em 19 jun. 2023.

HAUBEN, L. *et al.* Phylogenetic Position of Phytopathogens within the Enterobacteriaceae. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 384–397, ago. 1998. DOI:

[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80048-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9). Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202098800489?via%3Dihub>. Acesso em 19 jun. 2023.

JABUONSKI, R. E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, [s. l.], v. 11, n. 1, 1986.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, California, v. 60, p. 969–976, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-969>. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Abstracts/Phyto60_969.htm. Acesso em 19 jun. 2023.

KUMAR, A. *et al.* Evaluation of management of bacterial stalk rot of maize (*Dickeya zeae*) using some chemicals and bio-agents. **Journal of Applied and Natural Science**, Ludhiana, v. 8, n. 3, p. 1146–1151, 1 set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.31018/jans.v8i3.932>. Disponível em: <https://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/932>. Acesso em 19 jun. 2023.

KUMAR, A. *et al.* A review on bacterial stalk rot disease of maize caused by *Dickeya zeae*. **Journal of Applied and Natural Science**, Ludhiana, v. 9, n. 2, p. 1214–1225, 1 jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.31018/jans.v9i2.1348>. Disponível em: <https://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/1348>. Acesso em 19 jun. 2023.

KUMAR, A.; HUNJAN, M. S.; SINGH, H. K. AND P. P. Characterizing diversity of *Dickeya zeae* causing bacterial stalk rot of maize based on biochemical assays and antibiotic sensitivity. **Indian Phytopathology**, Punjab, v. 68, n. 4, p. 375-379, 2015.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília, DF: Ministério da Educação; Lavras: ESAL/FAEPE, 1988.

MAMEDE, M. C. *et al.* Detection of *Pantoea ananatis* in corn seeds on semi-selective medium. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 254–256, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0203-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40858-017-0203-z>. Acesso em 19 jun. 2023.

MAMEDE, M. C.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho. **Summa Phytopathologica**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 36–40, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/198561>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/zK9nfQsZpVGMK7HzwQQkFDL/?lang=pt>. Acesso em 19 jun. 2023.

MARTINEZ-CISNEROS, B. A. *et al.* First Report of Bacterial Stalk Rot of Maize Caused by *Dickeya zeae* in Mexico. **Plant Disease**, [s. l.], v. 98, n. 9, p. 1267–1267, 1 set. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0198-PDN>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-02-14-0198-PDN>. Acesso em 18 jun. 2023.

MAUDE, R. B. **Seedborne diseases and their control: principles and practice**. Wallingford: CAB INTERNATIONAL, 1996.

MYUNG, I.-S. *et al.* First report of bacterial stalk rot of sweet corn caused by *Dickeya zeae* in Korea. **New Disease Reports**, Goesan, v. 22, 31 dez. 2010. DOI: <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.022.015>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.5197/j.2044-0588.2010.022.015>. Acesso em 19 jun. 2023.

PÉROMBELON, M. C. M.; LUMB, V. M.; HYMAN, L. J. A rapid method to identify and quantify soft rot erwinias on seed potato tubers. **EPPO Bulletin**, Wageningen, v. 17, n. 1, p. 25–35, mar. 1987. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1987.tb00004.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2338.1987.tb00004.x>. Acesso em 19 jun. 2023.

PIERCE, L.; MCCAIN, A. H. Selective medium for isolation of pectolytic *Erwinia* sp. **Plant Disease**, California, v. 76, p. 382–384, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-76-0382>. Disponível em:

https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1992Abstracts/PD_76_382.htm. Acesso em 19 jun. 2023.

PROKIĆ, A. *et al.* Identification and characterization of *Dickeya zeae* strains associated with maize stalk soft-rot in northern Serbia. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 157, n. 3, p. 685–691, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02019-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-020-02019-4>. Acesso em 19 jun. 2023.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 07 jul. 2023.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; LOPES, C. A. Bacterial Top and Stalk Rot of Maize in Brazil. **Plant Disease**, [s. l.], v. 66, p. 519–520, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-66-519>. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1982Abstracts/PD_66_519.htm. Acesso em 17 jun. 2023.

SAH, D. N. Influence of environmental factors on infection of maize (*Zea mays* L.) by *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*. **Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science**, v. 12, p. 41–45, 1991.

SAMSON, R. *et al.* Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 1415–1427, 1 jul. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.02791-0>. Acesso em 17 jun. 2023.

SAUER, A. V. *et al.* Sobrevivência de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho, em restos culturais de milho. *In*: CD-Rom apresentado em XXVIII Congresso Nacional de

Milho e Sorgo. **Anais eletrônicos** [...]. [Goiânia]: Associação Brasileira de Milho e Sorgo., 2010. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25233/1/0595.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2019.

SCHAAD, N. W.; FORSTER, R. L. A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. **Phytopathology**, Kimberly, v. 75, n. 3, p. 260–263, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-260>. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Abstracts/Phyto75_260.htm. Acesso em 19 jun. 2023.

SILVA, I. G. *et al.* Métodos de inoculação de *Dickeya zeae* em milho-doce. *In*: II Congresso Online para Aumento de Produtividade do Milho e Soja (COMSOJA), 2019. **Anais eletrônicos** [...]. [Santa Maria]: 2019. Disponível em: <https://maissoja.com.br/metodos-de-inoculacao-de-dickeya-zeae-em-milho-doce/>. Acesso em: 21 dez. 2022.

SŁAWIAK, M. *et al.* Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 125, n. 2, p. 245–261, out. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9479-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-009-9479-2>. Acesso em 19 jun. 2023.

SURIANI *et al.* The presence of bacterial stalk rot disease on corn in Indonesia: A review. IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**, Makassar, v. 911, n. 1, p. 012058, 1 nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/911/1/012058>. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/911/1/012058>. Acesso em 19 jun. 2023.

TEBALDI, N. D. *et al.* Occurrence and detection of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in naturally contaminated maize seeds in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 698–702, 6 jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00514-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40858-022-00514-z>. Acesso em 19 jun. 2023.

THIND, B. S.; PAYAK, M. M. A review of bacterial stalk rot of maize in India. **Tropical Pest Management**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 311–316, 1 jan. 1985. DOI:

<https://doi.org/10.1080/09670878509371007>. Disponível em:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670878509371007>. Acesso em 19 jun. 2023.

TOTH, I. K. *et al.* Dickeya species: an emerging problem for potato production in Europe. **Plant Pathology**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 385–399, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x>. Disponível em:
<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x>. Acesso em 21 jun. 2023.

VIOLATTI, M. R.; TEBALDI, N. D. Detecção de Xanthomonas axonopodis pv. glycines em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 268–270, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2127>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/sp/a/CnGJB5kXzjVLH883YpRTXdG/?lang=pt>. Acesso em 19 jun. 2023.

WALDEE, E. L. **Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria**. 1942. Tese (Doutorado em Filosofia) - Iowa Stage College, [s. l.], 1942.

YANG, Y. *et al.* First Report of Stalk Bacterial Soft Rot of Sugarcane Caused by Dickeya zeae in China. **Plant Disease**, [s. l.], v. 105, n. 4, p. 1188–1188, 1 abr. 2021. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2234-PDN>. Disponível em:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-20-2234-PDN>. Acesso em 19 jun. 2023.

ZHANG, J. *et al.* Identification of Dickeya zeae as a Causal Agent of Bacterial Soft Rot in Banana in China. **Plant Disease**, Honolulu, v. 98, n. 4, p. 436–442, abr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0711-RE>. Disponível em:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-07-13-0711-RE>. Acesso em 21 jun. 2023.

CAPÍTULO 4

NANOPARTÍCULAS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Dickeya zae*, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* IN VITRO

RESUMO

Nanopartículas (NPs) de óxidos metálicos são amplamente usadas nos campos físico, químico e biológico e apresentam ação antibacteriana, sendo opção para o controle de bactérias fitopatogênicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de NPs puras e dopadas no controle de *Dickeya zae*, *Pantoea ananatis* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LABAC), do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia. Os isolados de *D. zae* (UFU M42-5), *P. ananatis* (UFU A18) e *X. vasicola* pv. *vasculorum* (UFU J29) foram recuperados e multiplicados em meio de cultura 523 por 24-48 horas a 28 °C. As NPs foram elaboradas no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores, do Instituto de Física da UFU. Cada NP foi preparada na dosagem de 10 mg mL⁻¹ de água filtrada esterilizada e agitadas para homogeneização dos cristais. Para determinação da toxidez a *D. zae* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*, foram usadas NPs puras (ZnO, ZnOCl, Ag₂O, CuO, FeO, MnO e NiO) e NPs de ZnO dopadas com: prata (Ag), cobre (Cu), ferro (Fe), potássio (K), magnésio (Mg), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e níquel (Ni), além de NPs de ZnOCl (Simonkolleite) dopadas com Ag, Cu e curcumina (Cur). Já para *P. ananatis* foram usadas as NPs de ZnO dopadas com potássio (K) e molibdênio (Mo), e NPs de ZnOCl puras e dopadas com Ag, Cu e Cur. Avaliou-se também a ação do fungicida/bactericida cúprico Kocide ® para as três bactérias. As placas de Petri foram incubadas em estufa a 28 °C por 72 horas. O diâmetro do halo de inibição foi avaliado em centímetros (cm). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dois adicionais: Concentrações das NPs dopadas e Kocide/NP pura com 3 repetições. Para as três bactérias, *D. zae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum* não houve formação de halo de inibição para as NPs puras de ZnO e ZnOCl. NPs de ZnO dopadas com Ag, K, Mg, Mn e Mo apresentaram atividade antibacteriana para *D. zae*; NPs de ZnO dopadas com K e Mo apresentaram atividade antibacteriana para *P. ananatis*; NPs de ZnO dopadas com Ag e Fe apresentaram atividade antibacteriana para *X. vasicola* pv. *vasculorum*. NPs de Ag₂O, CuO e NiO apresentaram atividade antibacteriana para *D. zae* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*. O produto Kocide apresentou atividade antibacteriana apenas para *D. zae*.

Palavras-chave: atividade antibacteriana, bactéria, ZnO.

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) of metallic oxides are widely used in the physical, chemical and biological fields and have antibacterial action, being an option for the control of phytopathogenic bacteria. The objective of this work was to evaluate the in vitro antibacterial activity of pure and doped NPs in the control of *Dickeya zae*, *Pantoea ananatis* and *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. The experiment was conducted at the Laboratory of Vegetal Bacteriology (LABAC), at the Institute of Agricultural Sciences at the Federal University of Uberlândia. Isolates of *D. zae* (UFU M42-5), *P. ananatis* (UFU A18) and *X. vasicola* pv. *vasculorum* (UFU J29) were recovered and grown in culture medium 523 for 24-48 hours at 28°C. The NPs were prepared at the Laboratory of New Insulating and Semiconducting Materials, at the UFU Institute of Physics. Each NP was prepared at a dosage of 10 mg mL⁻¹ of sterilized filtered water and stirred to homogenize the crystals. To determine toxicity to *D. zae* and *X. vasicola* pv. *vasculorum*, pure NPs (ZnO, ZnOCl, Ag₂O, CuO, FeO, MnO and NiO) and ZnO NPs doped with: silver (Ag), copper (Cu), iron (Fe), potassium (K), magnesium (Mg), manganese (Mn), molybdenum (Mo) and nickel (Ni), in addition to ZnOCl NPs (Simonkolleite) doped with Ag, Cu and curcumin (Cur). As for *P. ananatis*, ZnO NPs doped with potassium (K) and molybdenum (Mo), and pure ZnOCl NPs and doped with Ag, Cu and Cur were used. The action of the copper fungicide/bactericide Kocide® was also evaluated for the three bacteria. Petri dishes were incubated in an oven at 28°C for 72 hours. The diameter of the inhibition halo was evaluated in centimeters (cm). The experiment was conducted in a completely randomized design with two additions: concentrations of doped NPs and pure Kocide/NP with 3 replications. For the three bacteria, *D. zae*, *P. ananatis* and *X. vasicola* pv. *vasculorum* there was no formation of inhibition halo for pure ZnO and ZnOCl NPs. ZnO NPs doped with Ag, K, Mg, Mn and Mo showed antibacterial activity against *D. zae*; ZnO NPs doped with K and Mo showed antibacterial activity for *P. ananatis*; ZnO NPs doped with Ag and Fe showed antibacterial activity against *X. vasicola* pv. *vasculorum*. Ag₂O, CuO and NiO NPs showed antibacterial activity against *D. zae* and *X. vasicola* pv. *vasculorum*. The Kocide product showed antibacterial activity only for *D. zae*.

Keywords: antibacterial activity, bacteria, ZnO.

INTRODUÇÃO

A nanobiotecnologia é a junção entre a nanotecnologia com a área biológica. Seu uso é motivado principalmente devido as suas propriedades físico-químicas que permitem aplicações inovadoras numa ampla variedade de áreas. O tamanho nanométrico (1 a 100 nm) das nanopartículas (NPs) resulta em alta relação superfície/volume (KAH; HOFMANN, 2014) o que gera novas e interessantes propriedades, tanto físicas (SILVA et al., 2017) quanto biológicas (REIS et al., 2015). Cada nanômetro (nm) equivale a um bilionésimo de um metro (10^{-9} m) (NNI, [s.d.]), e os materiais nanoestruturados estão na mesma escala que as proteínas, DNA e vírus, sendo ainda menores que uma célula (10^4 a 10^5 nm) (WICHLAB, 2013).

NPs de óxidos metálicos são amplamente usadas nos campos físico, químico e biológico e entre suas aplicações, a ação antibacteriana atrai enorme interesse (KAVIYA et al., 2011). A ação antibacteriana das NPs pode ocorrer devido à desestabilização, degradação ou dissolução da membrana celular que permite interação da NP com compostos internos. A partir da desregulação ou liberação de íons tóxicos na membrana celular ocorre o bloqueio físico de canais de transporte celular ou a oxidação dos lipídeos por espécies reativas de oxigênio (EROS) (HOU et al., 2018).

Alguns compostos metálicos, especialmente óxidos metálicos inorgânicos (ZnO, MgO, entre outros), já possuem propriedades antimicrobianas (SAWAI, 2003), e seu potencial se intensifica na forma de NPs. Metais na forma de NPs geralmente possuem maior superfície de contato e menor tamanho cristalino, o que aumenta as vacâncias de oxigênio, aumenta a capacidade de difusão das moléculas e resulta em maior concentração de EROS (BECKER et al., 2011; HAJA HAMEED et al., 2013). Além disso, a alteração da estrutura física e eletrônica das NPs através da dopagem (incorporação de novos elementos) pode ajustar suas propriedades (BRINTHA; AJITHA, 2016; SHARMA et al., 2016; VIJAYAPRASATH et al., 2016).

É importante que as NPs sejam biocompatíveis e específicas (SOUSA et al., 2014) para que ao contrário de produtos químicos não causem o desenvolvimento de bactérias patogênicas resistentes (NEVES et al., 2021; PAVÃO et al., 2021). Diversos metais, tais como prata (Ag), ouro (Au), cobre (Cu), titânio (Ti) e zinco (Zn) ao serem sintetizados na forma de NPs têm sua atividade antibacteriana potencializada com menor impacto ao ambiente e à saúde humana (KARASENKOV et al., 2015).

O Brasil é o terceiro país com maior produção mundial de milho (116,0 milhões de t), ficando atrás apenas de China (272,6 milhões de t) e EUA (382,9 milhões de t) (FIESP, 2022). Para a safra 2022/23 é prevista produção total de 125,8 milhões de toneladas e produtividade de 6000 kg ha^{-1} (CONAB, 2022). Entre as doenças bacterianas que causam perdas à cultura do milho estão a mancha

branca do milho, causada por *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001), estria bacteriana do milho, causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (LANG et al., 2017), e podridão bacteriana, causada por *Dickeya zae* (SAMSON et al., 2005).

Áreas com severidade de 10-20% da mancha branca do milho tem sua fotossíntese reduzida a 40%, o que equivale a 60% de perdas na produção final da cultura (PINTO, 1999; GODOY; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2001). Com lesões necróticas que podem cobrir até 60% da área foliar, a estria bacteriana causa murcha da planta e, em locais onde a incidência da doença foi superior a 90%, a área foliar infectada ultrapassou 50% (QHOBELA; CLAFLIN; NOWELL, 1990; KORUS et al., 2017; LANG et al., 2017; LEITE JR et al., 2018; PLAZAS et al., 2018; ARIAS et al., 2020; ORTIZ-CASTRO et al., 2020). Identificada no Brasil por Reifschneider e Lopes (1982), a podridão bacteriana pode ocorrer em um ou em vários internódios do milho acima da superfície do solo (KUMAR et al., 2016), leva à maceração do caule e dos entrenós, descoloração dos tecidos infectados e amolecimento, por fim a planta tomba, o que resulta em graves perdas de rendimento de grãos (KUMAR; HUNJAN; SINGH, 2015).

Incluir o uso de produtos menos tóxicos e mais específicos é estratégia que motiva a pesquisa, o potencial bactericida das NPs têm sido amplamente estudado e fornece evidências promissoras no controle de diferentes tipos de doenças bacterianas (QI et al., 2020; FRAGA et al., 2021; SILVA et al., 2021; MAMEDE et al., 2022).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de NPs puras e dopadas no controle de *D. zae*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LABAC), do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

1 Preparo dos isolados

Os isolados de *D. zae* (UFU M42-5), *P. ananatis* (UFU A18) e *X. vasicola* pv. *vasculorum* (UFU J29) foram recuperados e multiplicados em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24 - 48 horas a 28 °C. Para cada isolado, após 48 h foi preparada suspensão bacteriana em água filtrada esterilizada e ajustada em espectrofotômetro para $OD_{550} = 0,5$ (aproximadamente 10^9 UFC mL⁻¹).

2 Preparo das nanopartículas (NPs)

As NPs foram elaboradas em diferentes concentrações (Tabela 4.1) no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores, do Instituto de Física da UFU. Cada NP foi preparada na dosagem de 10 mg mL⁻¹ de água filtrada autoclavada esterilizada e agitadas para homogeneização dos cristais. Posteriormente foram feitas diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻²) de cada NP.

Tabela 4.1. Nanopartículas em suas respectivas concentrações. Uberlândia - MG, 2021.

NPs Dopadas	Concentração (%)			
	ZnO	AgO	CuO	FeO
ZnO Ag	0,7	1	9	11
ZnO Cu	1	4	8	
ZnO Fe	0,5	1	5	
ZnO K	0,5	1	5	10
ZnO:Mg	0,5	1		
ZnO:Mn	0,2	0,4	0,8	
ZnO:Mo	0,5	1	5	10
ZnO:Ni	0,3	1	3	
ZnOCl:Ag	0,1	1	5	10
ZnOCl:Cu	0,1	1	5	10
ZnOCl:Cur				

NPs Puras	ZnO	AgO	CuO	FeO	MnO	NiO	ZnOCl
-----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-------

ZnO:Ag: Óxido de Zinco dopado com Prata; ZnO:Cu: Óxido de Zinco dopado com Cobre; ZnO:Fe: Óxido de Zinco dopado com Ferro; ZnO:K: Óxido de Zinco dopado com Potássio; ZnO:Mg: óxido de Zinco dopado com Magnésio; ZnO:Mn: Óxido de Zinco dopado com Manganês; ZnO:Mo: Óxido de Zinco dopado com Molibdênio; ZnO:Ni: Óxido de Zinco dopado com Níquel; ZnOCl:Ag: Simonkolleite dopado com Prata; ZnOCl:Cu: Simonkolleite dopado com Cobre; ZnOCl:Cur: Simonkolleite dopado com Curcumina; ZnO: Óxido de zinco; AgO: Óxido de Prata; CuO: Óxido de Cobre; FeO: Óxido de Ferro; MnO: Óxido de Manganês; NiO: Óxido de Níquel; ZnOCl: Simonkolleite.

3 Determinação da toxidez das nanopartículas as diferentes bactérias

Em placas de Petri foi adicionada camada básica de meio ágar-água 2% e sobre esta, outra camada de meio nutritivo semissólido (0,8%) acrescida de 10% da suspensão bacteriana (aproximadamente 10⁹ UFC mL⁻¹) (ROMEIRO, 2001). A seguir, 5 discos de papel filtro esterilizado

(6 mm) foram depositados sobre o meio e embebidos com 10 μ L de solução de cada NP, nas diferentes diluições (Figura 4.1).

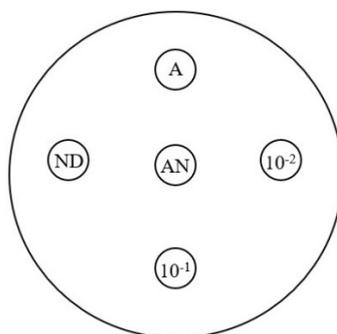


Figura 4.1. Esquema de distribuição dos discos de papel em placas de Petri contendo meio de cultura. (A) Água filtrada autoclavada, (10^{-2}) 2x diluído, (10^{-1}) 1x diluído, (ND) não diluído e (AN) antibiótico.

Como controle negativo foi usada água filtrada esterilizada e como controle positivo, de acordo com trabalhos anteriores e testes realizados previamente, estreptomicina ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para *P. ananatis* e cefalexina ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para *D. zea* e *X. vasicola* pv. *vascolorum*.

Para determinação da toxidez à *D. zea* e *X. vasicola* pv. *vascolorum*, foram usadas NPs puras (ZnO, ZnOCl, Ag₂O, CuO, FeO, MnO e NiO) e NPs de ZnO dopadas com: prata (Ag), cobre (Cu), ferro (Fe), potássio (K), magnésio (Mg), manganês (Mn), molibdênio (Mo), e níquel (Ni), além de NPs de ZnOCl (Simonkolleite) dopadas com Ag, Cu e curcumina (Cur). Já para *P. ananatis* foram usadas as NPs de ZnO dopadas com: potássio (K) e molibdênio (Mo), e NPs de ZnOCl puras e dopadas com Ag, Cu e Cur pois as demais já haviam sido avaliadas (MAMEDE et al., 2022).

Avaliou-se também a aplicação de cobre comercial (2 mg mL^{-1}), o qual contém 35% de Cu metálico na forma de hidróxido de cobre (Cu(OH)₂). O cobre comercial a 2 mg mL^{-1} contém Cu a aproximadamente $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$.

As placas de Petri foram incubadas em estufa a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. O diâmetro do halo de inibição foi avaliado em centímetros (cm). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, onde os tratamentos foram compostos por diferentes concentrações das NPs dopadas e dois adicionais: Hidróxido de cobre e NP pura.

4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade, utilizando o software R (R CORE TEAM, 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os três gêneros bacterianos, *D. zea*, *P. anantis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum* não houve inibição de crescimento para as NPs puras de ZnO e ZnOCl. Assim como nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , nenhuma das NPs testadas apresentou halo de inibição (dados não mostrados).

No controle de *D. zea* *in vitro*, os dados foram significativos com diferença no tamanho dos halos de inibição (cm) entre as NPs de acordo com a concentração do elemento dopante (Tabela 4.2). Em todos os tratamentos, o uso do antibiótico cefalexina inibiu o crescimento de *D. zea* (1,02 cm) e a água (veículo utilizado para aplicação das NPs) não formou halo de inibição.

Tabela 4.2. Halo de inibição do crescimento (cm) de *D. zea* por NPs a 10 mg mL^{-1} .

NPs dopadas	Concentrações dos elementos dopantes				NPs puras
	0,7	1,0	9,0	11,0	
ZnO:Ag	0,00 B*+	0,70 A+	0,80 A+	0,00 B*+	*AgO 0,80
ZnOCl:Ag	0,00 B*+	0,79 A+	0,00 B*+	0,80 A+	
ZnO:K	0,95 A	0,85 A+	0,00 B+	0,00 B+	
ZnO:Mg	0,00 B+	0,95 A			
ZnO:Mn	0,70 A*+	0,00 B+	0,75 A*+		*MnO 0,00
ZnO:Mo	0,79 B+	0,91 A+	0,00 C+	0,81 B+	
ZnO	0,00				
ZnOCl	0,00				
+ Hidróxido de cobre	1,10				
Cefalexina	1,02				
H₂O	0,00				

Médias seguidas por letras maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. * Difere pelo teste de Dunnett para NP puras e + para hidróxido de cobre.

NPs de Ag são uma das mais exploradas e difundidas no controle de microorganismos devido à alta atividade antimicrobiana dos íons prata. Observa-se que tanto para as NPs de ZnO dopadas com Ag quanto para as de ZnOCl dopadas com Ag, houve atividade antibacteriana, mostrando que a dopagem foi crucial na melhoria do desempenho da NP de ZnO e de ZnOCl. NPs de ZnO:1,0Ag; 9,0Ag e NPs de ZnOCl:1,0Ag e ZnOCl:10,0Ag inibiram o crescimento bacteriano, com maior halo de inibição (0,80cm) para ZnO:9,0Ag e ZnOCl:10,0Ag, com efeito similar à NP pura de Ag₂O (0,80cm).

Entre as NPs de ZnO:K, apenas as menores concentrações apresentaram atividade antibacteriana com halo de inibição de 0,95 cm e 0,85 cm (ZnO:1,0K). Para as NPs de ZnO:Mg e ZnO:Mo a concentração de 1,0 formou os maiores halos de inibição (0,95 cm e 0,91 cm, respectivamente). Apesar de um composto à base de cobre, as únicas NPs que tiveram seu efeito similar ao hidróxido de cobre (1,10 cm) foram as NP de ZnO:0,5K e ZnO:1,0Mg (0,95 cm). O efeito da dopagem nas NPs de ZnO:Mn permitiu explorar a atividade antibacteriana desses dois elementos, uma vez que em sua estruturação pura (ZnO e MnO) nenhum dos elementos formou halo de inibição. As melhores concentrações foram as de ZnO:0,2Mn e ZnO:0,8Mn (0,70 cm e 0,75 cm respectivamente).

NPs de ZnO:Fe, ZnO:Ni, ZnOCl:Cu e ZnOCl:Cur não foi observado a inibição do crescimento bacteriano (dados não mostrados). O hidróxido de cobre inibiu o crescimento de *D. zea* com halo de 1,10 cm. Entre as NPs puras, apenas as NPs de Ag₂O, CuO e NiO formaram halo de inibição (0,80 cm) (Figura 4.2).

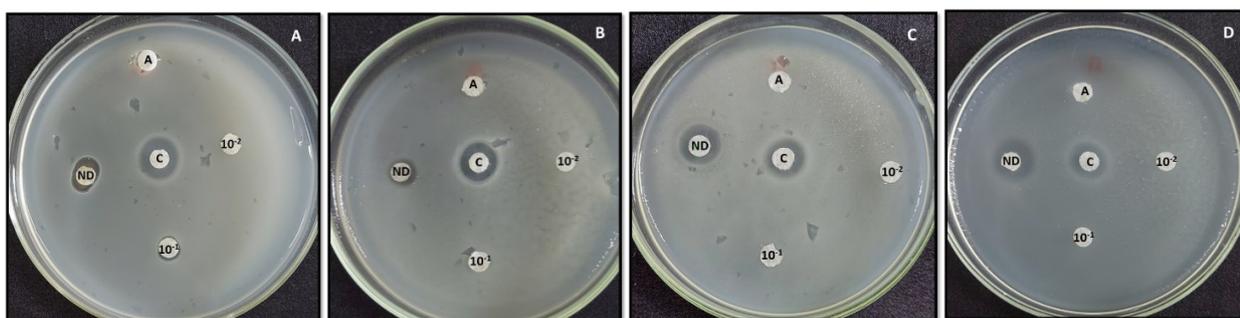


Figura 4.2. Halo de inibição de *D. zea* por nanopartículas puras. (A) Ag₂O; (B) CuO; (C) NiO; (D) Hidróxido de cobre.

Para o controle de *P. ananatis in vitro*, as médias para os halos de inibição (cm) das NPs foram significativos com diferenças de acordo com a concentração do elemento dopante (Tabela 4.3). E, em

todos os tratamentos, para os controles, houve crescimento de *P. ananatis* na água e inibição em estreptomicina com formação de halo de 1,16 cm.

Tabela 4.3. Halo de inibição do crescimento (cm) de *P. ananatis* por nanopartículas a 10 mg mL⁻¹.

NPs dopada	Concentrações dos elementos dopantes			
ZnO:K	0,5	1	5	10
	0,00 B	1,00 A+	0,00 B	0,90 A+
ZnO:Mo	0,5	1	5	10
	1,10 B+	1,30 A+	0,00 C	0,00 C
ZnO	0,00			
ZnOCl	0,00			
+ Hidróxido de cobre	0,00			
Estreptomicina	1,16			
H₂O	0,00			

Médias seguidas por letras maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. + Difere pelo teste de Dunnett para hidróxido de cobre.

As diferentes concentrações das NPs de ZnO, dopadas com K (1,0 e 10,0) e Mo (0,5 e 1,0) inibiram o crescimento bacteriano de *P. ananatis* (Tabela 4.3). E entre as NPs dopadas, NPs de ZnOCl:Ag, ZnOCl:Cu e ZnOCl:Cur não formaram halo de inibição (dados não mostrados). As maiores zonas de inibição foram de 1,00 cm e 1,30 cm, para ZnO:1,0K e ZnO:1,0Mo, respectivamente (Figura 4.3).

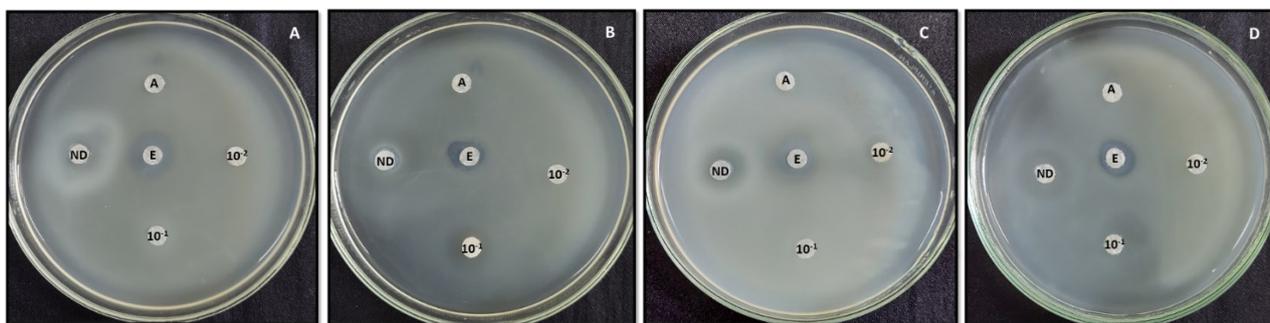


Figura 4.3. Halo de inibição em *P. ananatis* por NPs dopadas. (A) ZnO:1,0K; (B) ZnO:10,0K; (C) ZnO:0,5Mo; (D) ZnO:1,0Mo.

Para *X. vasicola* pv. *vascolorum* as médias para os halos de inibição (cm) das NPs foram significativos de acordo com a concentração dos elementos dopantes (Tabela 4.4) e em todos os tratamentos, houve crescimento de *X. vasicola* pv. *vascolorum* na água e inibição do crescimento na presença da estreptomicina, com formação de halo de 1,12 cm.

Tabela 4.4. Halo de inibição do crescimento (cm) de *X. vasicola* pv. *vascolorum* por NPs a 10 mg mL⁻¹.

NPs dopada	Concentrações dos elementos dopantes				NPs pura
	0,7	1	9	11	
ZnO:Ag	0,90 A*+	1,15 A+	1,20 A+	0,90 A*+	*Ag₂O 1,45
ZnOCl:Ag	0,1 0,00 B*	5 0,85 A*+			
ZnO:Fe	0,5 0,00 B	1 0,90 A*+	5 0,00 B		*FeO 0,00
ZnO	0,00				
ZnOCl	0,00				
+ Hidróxido de cobre	0,00				
Estreptomicina	1,12				
H₂O	0,00				

Médias seguidas por letras maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. * Difere pelo teste de Dunnett para NP puras e + para hidróxido de cobre.

Observa-se que apenas as NPs de ZnO:Ag, ZnOCl:Ag, ZnO:Fe e NP de Ag₂O apresentaram atividade antibacteriana e as NPs de ZnO dopadas com Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, K, ZnOCl:Cu e ZnOCl:Cur não inibiram o crescimento bacteriano (dados não mostrados). As NPs de Ag apresentaram efeito antibacteriano em todas as concentrações testadas (Figura 4.4) e embora as NPs de ZnO, ZnOCl, FeO, MnO não inibiram o crescimento bacteriano, as NPs de Ag₂O (1,45 cm), CuO (0,95 cm) e NiO (1,90 cm) apresentaram halos de inibição (Figura 4.5).

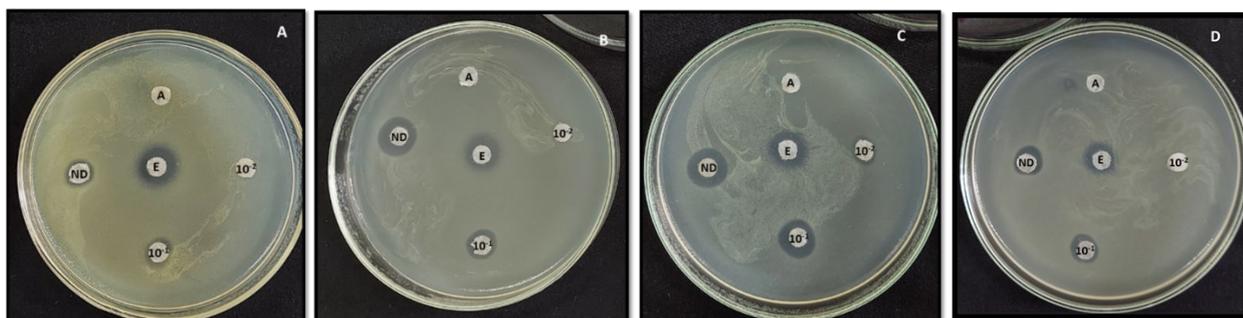


Figura 4.4. Halo de inibição em *X. vasicola* pv. *vasculorum* por nanopartículas de ZnO:Ag. (A) ZnO:0,7Ag; (B) ZnO:1,0Ag; (C) ZnO:9,0Ag e (D) ZnO:11,0Ag.

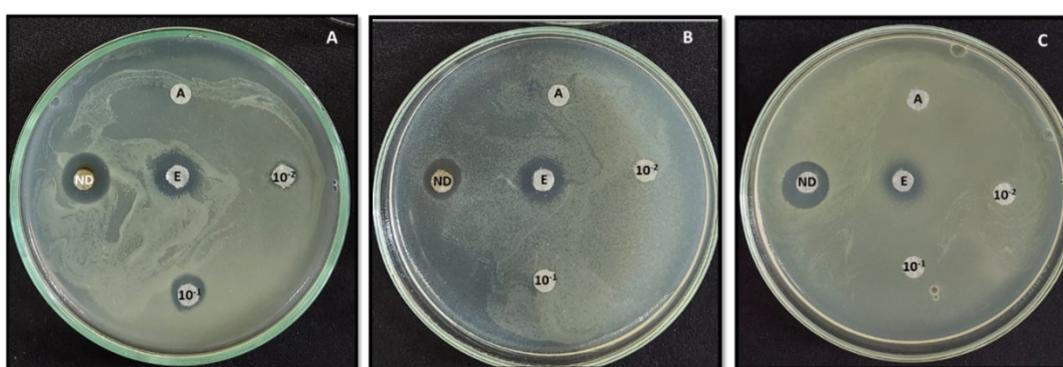


Figura 4.5. Halo de inibição de *X. vasicola* pv. *vasculorum* por nanopartículas puras. (A) Ag₂O; (B) CuO e (C) NiO.

Os maiores halos de inibição foram observados nas concentrações de ZnO:1,0Ag (1,15 cm) e ZnO:9Ag (1,20 cm), os quais se assemelharam a NP pura AgO (1,45 cm). E, apesar de formar halo, a NP de ZnOCl₂:5,0Ag (0,85 cm) teve menor atividade antibacteriana quando comparada às NPs de ZnO:Ag em qualquer concentração. Simonkolleite (ZnOCl) também conhecido como hidróxido cloreto de zinco monohidratado - Zn₅(OH)₈Cl₂·H₂O é formado pela corrosão de zinco na forma de cristais, e assim como ZnO, as vacâncias de oxigênio na superfície de ZnOCl são elétrica e quimicamente ativas (SITHOLE et al., 2012).

Observa-se que, para as NPs puras (ZnO e FeO), a dopagem gerou bons resultados, com 0,90 cm de halo de inibição para ZnO:1,0Fe. NPs de ZnO:Fe também já foram testadas em *P. ananatis* e assim como para *X. vasicola* pv. *vasculorum*, apresentaram atividade antibacteriana (MAMEDE et al., 2022).

O hidróxido de cobre não inibiu o crescimento *in vitro* de *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*, resultados diferentes dos encontrados por Fraga et al. (2021) que observaram redução na AACPD ao avaliar o controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas* spp.) a partir da

aplicação de hidróxido de cobre. Especula-se que os isolados possam ser resistentes ao produto ou devido ao meio de exposição (difusão em disco) sua toxicidade pode ter sido alterada, reduzindo seu efeito sobre as bactérias.

Entre os isolados foi observado que as NPs de ZnO:Ag, ZnO:K, ZnO:Mo, ZnOCl:Ag, Ag₂O, CuO e NiO apresentaram maior espectro de controle. E, para a maioria das NPs o aumento na concentração do elemento dopante não interferiu no tamanho do halo de inibição do crescimento bacteriano. Czyżowska e Barbasz, (2020) relataram que a atividade antibacteriana das NPs depende principalmente do método de síntese da NP e dos efeitos das cargas de superfície resultantes.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) também explica a eficácia desses compostos, quanto mais EROS produzidas pelo composto, maior é sua atividade antibacteriana (LIN et al., 2017; NING et al., 2017). As EROS radicais superóxido (O₂⁻), hidroxila (OH⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio singlete (¹O₂) podem atacar diretamente as membranas celulares e inativar as bactérias ou acumularem no citoplasma (CZYŻOWSKA; BARBASZ, 2020).

A dopagem das NPs de ZnO com íons metálicos como Ag, Fe, K e Mo pode melhorar a capacidade do ZnO de produzir EROS, levando à morte celular ou, o acúmulo de NPs de ZnO na superfície da membrana pode suprimir seu crescimento adicional devido à ligação das NPs a membrana bacteriana a partir de uma interação eletrostática (NPs têm carga positiva e a membrana bacteriana têm carga negativa) (AHMED et al., 2018). Além disso, as NPs liberam íons, estes íons reagem com as proteínas presentes nas células bacterianas, levando à morte (ZHANG; CHEN, 2009).

A atividade antibacteriana *in vitro* de NPs de ZnO:Ag já foram testadas para *P. ananatis* onde todas as concentrações testadas apresentaram halo de inibição, além desta, NPs de ZnO:Fe também foram testadas (MAMEDE et al., 2022) e, assim como para *X. vasicola* pv. *vasculorum*, apresentaram atividade antibacteriana. Trabalhos anteriores já constataram a capacidade das NPs de K e Mo no controle de bactérias em sementes. Fraga et al. (2021) usaram NPs de ZnO:0,5 Mo; ZnO:1,0K e ZnO:1,0Mg no tratamento de sementes de tomate. As NPs reduziram a população bacteriana sem prejudicar sua qualidade fisiológica. Com destaque para a NP de ZnO:1,0K que reduziu a população de *Xanthomonas* spp. nas sementes para 13%.

O uso de NPs possui aplicações promissoras na cultura do milho tanto no desenvolvimento de produtos químicos para controle de bacterioses quanto no uso em tratamento de sementes. Muitas NPs além de estarem associados a sanidade podem fornecer nutrientes para o crescimento e desenvolvimento da semente (CARLESSO et al., 2021; GONÇALVES, 2021).

CONCLUSÃO

NPs de ZnO e ZnOCl não apresentaram atividade antibacteriana para *D. zea*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vascolorum*.

NPs de ZnO e ZnOCl dopadas com Ag, NPs de ZnO dopadas com K e Mo e os óxidos de Ag, Cu e Ni inibiram o crescimento *n vitro* com maior atividade antibacteriana para os isolados de *D. zea*, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vascolorum*.

O hidróxido de cobre apresentou atividade antibacteriana apenas para *D. zea*.

REFERÊNCIAS

AHMED, B. *et al.* Well-controlled in-situ growth of 2D WO₃ rectangular sheets on reduced graphene oxide with strong photocatalytic and antibacterial properties. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 347, p. 266–278, abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.069>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389417309767?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

ARIAS, S. L. *et al.* Occurrence in Seeds and Potential Seed Transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vascolorum* in Maize in the United States. **Phytopathology**®, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1139–1146, march. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-19-0306-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-08-19-0306-R#>. Acesso em 15 jun 2023.

BECKER, J. *et al.* Tuning of the Crystallite and Particle Sizes of ZnO Nanocrystalline Materials in Solvothermal Synthesis and Their Photocatalytic Activity for Dye Degradation. **The Journal of Physical Chemistry C**, [s. l.], v. 115, n. 28, p. 13844–13850, 21 jul. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp2038653>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp2038653>. Acesso em 21 jun. 2023.

BRINTHA, S.; AJITHA, M. Synthesis, Structural and Antibacterial Activity of Aluminium and Nickel Doped ZnO Nanoparticles by Sol-gel Method. **Asian Journal of Chemical Sciences**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–9, 10 jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.9734/AJOCS/2016/29704>. Disponível em: <https://journalajocs.com/index.php/AJOCS/article/view/72>. Acesso em 21 jun. 2023.

CARLESSO, L. C. *et al.* Qualidade sanitária das sementes de híbridos de milho tratadas com nanopartículas de cobre/ Sanitary quality of maize hybrid seeds treated with copper nanoparcales. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 42234–42246, 27 abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-607>. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/28865>. Acesso em 21 jun. 2023.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Boletim da safra de grãos: 12º levantamento: safra 2020/2021**. Brasília, DF, 2021. Portal. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em 19 jun. 2023.

CZYŻOWSKA, A.; BARBASZ, A. A review: zinc oxide nanoparticles – friends or enemies? **International Journal of Environmental Health Research**, Kraków, p. 1–17, 10 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1805415>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09603123.2020.1805415>. Acesso em 21 jun. 2023.

Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP). **Safra Mundial de Milho 2022/23 – 8º levantamento do USDA**, São Paulo, dez. 2022. Disponível em: <https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/file-20221213172618-boletimmilhodezembro2022/>. Acesso em 15 jun. 2023.

FRAGA, F. S. *et al.* Doped zinc-oxide nanocrystals for the control of tomato bacterial spot and *Xanthomonas gardneri* in seeds. **Tropical Plant Pathology**, Uberlândia, v. 46, p. 406-413, mai. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00436-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40858-021-00436-2>. Acesso em 21 jun. 2023.

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 2, p. 209–215, jun. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100->

[41582001000200017](https://doi.org/10.1590/S1516-7438202300017).

Disponível

em:

<https://www.scielo.br/j/fb/a/QS37wLdvDNHhDyPrB78wTnM/?lang=pt>. Acesso em 21 jun. 2023.

GONÇALVES, J. P. Z. **Síntese verde de nanopartículas de óxido de manganês: avaliação dos parâmetros de processo e aplicação no tratamento de sementes de milho**. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

HAJA HAMEED, A. S. *et al.* Impact of alkaline metal ions Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺ on the structural, optical, thermal and antibacterial properties of ZnO nanoparticles prepared by the co-precipitation method. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 1, n. 43, p. 5950, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3tb21068e>.

Disponível

em:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/TB/c3tb21068e>. Acesso em 21 jun. 2023.

HOU, J. *et al.* Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms. **Chemosphere**, Beijing, v. 193, p. 852–860, fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.077>.

Disponível

em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653517318544?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, Vienna, v. 63, p. 224–235, fev. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>.

Disponível

em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0160412013002754?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

KARASENKOV, Y. *et al.* Colloidal metal oxide nanoparticle systems: the new promising way to prevent antibiotic resistance during treatment of local infectious processes. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [s. l.], v. 98, p. 012038, nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012038>.

Disponível

em:

<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/98/1/012038>. Acesso em 21 jun. 2023.

KAVIYA, S. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Chennai, v. 79, n. 3, p. 594–598, ago. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.040>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386142511002034?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

KORUS, K. *et al.* First Report of *Xanthomonas vasicola* Causing Bacterial Leaf Streak on Corn in the United States. **Plant Disease**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 1030, jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1426-PDN>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-16-1426-PDN>. Acesso em 16 de jun. 2023.

KUMAR, A. *et al.* Evaluation of management of bacterial stalk rot of maize (*Dickeya zea*) using some chemicals and bio-agents. **Journal of Applied and Natural Science**, Ludhiana, v. 8, n. 3, p. 1146–1151, 1 set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.31018/jans.v8i3.932>. Disponível em: <https://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/932>. Acesso em 19 jun. 2023.

KUMAR, A.; HUNJAN, M. S.; SINGH, H. K. AND P. P. Characterizing diversity of *Dickeya zea* causing bacterial stalk rot of maize based on biochemical assays and antibiotic sensitivity. **Indian Phytopathology**, Punjab, v. 68, n. 4, p. 375-379, 2015.

LANG, J. M. *et al.* Detection and Characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. Causing Bacterial Leaf Streak of Corn in the United States. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 107, n. 11, p. 1312–1321, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0168-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-05-17-0168-R>. Acesso em 16 jun. 2023.

LEITE JR, R. P. *et al.* Estria Bacteriana do Milho no Paraná. **Informe da Pesquisa**, Londrina, n. 160, p. 7-18, jul. 2018.

LIN, Q. Y. *et al.* Effect of modified iodine on defect structure and antibacterial properties of ZnO in visible light. **Res Chem Intermed**, Fuzhou, v. 43, p. 5067–5081, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s11164-017-3053-x>. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11164-017-3053-x>. Acesso em 21 jun. 2023.

MAMEDE, M. C. *et al.* Nanoparticles in inhibiting *Pantoea ananatis* and to control maize white spot. **Ciência Rural**, Uberlândia, v. 52, n. 7, p. e20210481, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210481>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/cr/a/bqm4S6YrG3Bqyh8YBj8SR8B/?lang=en>. Acesso em 21 jun. 2023.

NEVES, M. L. DA R. *et al.* A influência do quórum sensing na formação do biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. e33910212659–e33910212659, 18 fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12659>. Disponível em:
<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12659>. Acesso em 21 jun. 2023.

NING, S. N. *et al.* Dual couples Bi metal depositing and Ag@AgI islanding on BiOI 3D architectures for synergistic bactericidal mechanism of *E. coli* under visible light. **Applied Catalysis B: Environmental**, Fuzhou, v. 204, p. 1–10, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.11.006>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926337316308645?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

National Nanotechnology Initiative (NNI). **About Nanotechnology**. United States, [s. d.]. Disponível em: <https://www.nano.gov/about-nanotechnology>. Acesso em 19 out. 2022.

ORTIZ-CASTRO, M. *et al.* Current Understanding of the History, Global Spread, Ecology, Evolution, and Management of the Corn Bacterial Leaf Streak Pathogen, *Xanthomonas vasculorum*. **Phytopathology**®, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1124–1131, 9 abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-20-0018-PER>. Disponível em:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-01-20-0018-PER>. Acesso em 17 jun. 2023.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *et al.* Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Sete Lagoas, v. 149, n. 5, p. 275–279, 2001.

DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>. Acesso em 19 jun. 2023.

PAVÃO, D. P. E *et al.* Capacidade de formação de biofilme por cepas bacterianas e ação antibiofilme do extrato de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). **Revista Fitos**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 153–165, 30 jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.32712/2446-4775.2021.1073>. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/1073>. Acesso em 21 jun. 2023.

PINTO, N. 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. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 1007–1010, 1999.

PLAZAS, M. C. *et al.* First Report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* Causing Bacteria Leaf Streak of Maize (*Zea mays*) in Argentina. **Plant Disease**, [s. l.], v. 102, n. 5, p. 1026–1026, maio 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1578-PDN> . Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-17-1578-PDN>. Acesso em 17 jun. 2023.

QHOBELA, M.; CLAFLIN, L. E.; NOWELL, D. C. Evidence that *Xanthomonas campestris* pv. *zetae* can be distinguished from other pathovars capable of infecting maize by restriction fragment length polymorphism of genomic DNA. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 183–186, jun. 1990. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060669009501024> . Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07060669009501024>. Acesso em 17 jun. 2023.

QI, K. *et al.* Transition metal doped ZnO nanoparticles with enhanced photocatalytic and antibacterial performances: Experimental and DFT studies. **Ceramics International**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 1494–1502, 1 fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.09.116> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0272884219326471?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 07 jul. 2023.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; LOPES, C. A. Bacterial Top and Stalk Rot of Maize in Brazil. **Plant Disease**, [s. l.], v. 66, p. 519–520, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-66-519>. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1982Abstracts/PD_6_519.htm. Acesso em 17 jun. 2023.

REIS, E. M. *et al.* Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the *in vitro* micronucleus test and the *in vivo* wing somatic mutation and recombination test. **Food and Chemical Toxicology: Elsevier**, [s. l.], n. 84, p. 55–63, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.07.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691515300168?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

SAMSON, R. *et al.* Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 1415–1427, 1 jul. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.02791-0>. Acesso em 17 jun. 2023.

SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. **Journal of Microbiological Methods**, Kanagawa, v. 54, n. 2, p. 177–182, ago. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00037-X). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016770120300037X?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

SHARMA, N. *et al.* Synthesis, characterisation and antimicrobial activity of manganese- and iron-doped zinc oxide nanoparticles. **Journal of Experimental Nanoscience**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 54–71, 2 jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/17458080.2015.1025302>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17458080.2015.1025302>. Acesso em 21 jun. 2023.

SILVA, A. C. A. *et al.* Functional Nanocrystals: Towards Biocompatibility, Nontoxicity and. **Advances in Biochemistry & Applications in Medicine**, Uberlândia, p. 1-28, 2017.

SILVA, A. C. A. *et al.* Synergistic effect of simonkolleite with zinc oxide: Physico-chemical properties and cytotoxicity in breast cancer cells. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 266, p. 124548, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124548>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S025405842100331X?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

SITHOLE, J. *et al.* Simonkolleite nano-platelets: Synthesis and temperature effect on hydrogen gas sensing properties. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 258, n. 20, p. 7839–7843, ago. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.04.073>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169433212007271?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

SOUSA, C. J. A. *et al.* Synthesis and characterization of zinc oxide nanocrystals and histologic evaluation of their biocompatibility by means of intraosseous implants. **International Endodontic Journal**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 416–424, maio 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/iej.12164>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.12164>. Acesso em 21 jun. 2023.

VIJAYAPRASATH, G. *et al.* Role of nickel doping on structural, optical, magnetic properties and antibacterial activity of ZnO nanoparticles. **Materials Research Bulletin**, [s. l.], v. 76, p. 48–61, abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2015.11.053>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025540815302488?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

Research – Wich Reaseach Lab (WICHLAB). **Research**. Australia, 2013. Disponível em: <https://www.wichlab.com/research/>. Acesso em 19 out. 2022.

ZHANG, H.; CHEN, G. Potent Antibacterial Activities of Ag/TiO₂ Nanocomposite Powders Synthesized by a One-Pot Sol–Gel Method. **Environmental Science & Technology**, Hong Kong, v.

43, n. 8, p. 2905–2910, 15 abr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/es803450f>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es803450f>. Acesso em 21 jun. 2023.

CAPÍTULO 5

NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE DOENÇAS BACTERIANAS FOLIARES NA CULTURA DO MILHO

RESUMO

O uso de nanopartículas (NPs) é relativamente recente e visa explorar o desenvolvimento de produtos com características antimicrobianas. Os objetivos destes trabalhos são avaliar o uso de NPs de ZnO, NiO e NPs de ZnO dopadas com Ag em aplicação preventiva e curativa no controle da mancha branca (MBM) e estria bacteriana do milho (EBM). Isolados de *Pantoea ananatis* (*P. ananatis*) e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*X. vasicola* pv. *vasculorum*) foram cultivados em meio de cultura. Após 15 dias da semeadura (3 a 4 folhas), em aplicação preventiva, as plantas de milho foram pulverizadas com NPs de ZnO, NiO, ZnO:0,7Ag, ZnO: 1,0Ag e ZnO:9,0Ag, cobre ou água e 3 dias após as plantas foram inoculadas com a suspensão bacteriana (10^8 UFC mL⁻¹) individualmente com *P. ananatis* ou *X. vasicola* pv. *vasculorum* e em conjunto com *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*. Na aplicação curativa, as plantas foram inoculadas com a suspensão bacteriana e 3 dias após pulverizadas com os produtos a 2 mg mL⁻¹. Os experimentos foram realizados em esquema fatorial (2x5+1) com 4 repetições, sendo 2 controles (preventivo e curativo), 5 produtos (ZnO, NiO, ZnO:0,7Ag, ZnO:1,0Ag e ZnO:9,0Ag) e dois adicionais (cobre e água). A severidade da MBM e da EBM foi avaliada e calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). NPs de NiO reduziram a severidade da MBM e da EBM em aplicações preventivas e curativas e o cobre aumentou a severidade da MBM, porém reduziu a severidade da EBM.

Palavras-chave: *Zea mays*, *Pantoea ananatis*, *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*.

ABSTRACT

The use of nanoparticles (NPs) is relatively recent and aims to explore the development of products with antimicrobial characteristics. The objectives of these works are to evaluate the use of ZnO NPs, NiO and Ag-doped ZnO NPs in preventive and curative application in the control of white spot (MBM) and bacterial streak of maize (EBM). Isolates from *Pantoea ananatis* (*P. ananatis*) and *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*X. vasicola* pv. *vasculorum*) were grown in culture medium. Fifteen days after sowing (3 to 4 leaves), in preventive application, the corn plants were sprayed with NPs of ZnO, NiO, ZnO:0.7Ag, ZnO: 1.0Ag and ZnO:9.0Ag, copper or water and 3 days later the plants were inoculated with the bacterial suspension (10⁸ CFU mL⁻¹) individually with *P. ananatis* or *X. vasicola* pv. *vasculorum* and together with *P. ananatis* and *X. vasicola* pv. *vasculorum*. In the curative application, the plants were inoculated with the bacterial suspension and 3 days later sprayed with the products at 2 mg mL⁻¹. The experiments were carried out in a factorial scheme (2x5+1) with 4 repetitions, with 2 controls (preventive and curative), 5 products (ZnO, NiO, ZnO:0.7Ag, ZnO:1.0Ag and ZnO:9.0Ag) and two additional ones (copper and water). The severity of MBM and EBM was assessed and the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated. NiO NPs reduced MBM and EBM severity in preventive and curative applications and copper increased MBM severity but reduced EBM severity.

Keywords: *Zea mays*, *Pantoea ananatis*, *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*.

INTRODUÇÃO

A mancha branca do milho (MBM), causada pela bactéria *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001), é encontrada em todas as regiões produtoras de milho do país e é considerada uma doença endêmica no Brasil (ESCANFERLA et al., 2018). Com severidade de 10-20%, a redução da área fotossintética devido à presença de lesões necróticas levam a perdas de até 60% na produção (PINTO, 1999; GODOY; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2001).

A estria bacteriana do milho (EBM), causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb) comb. nov. (KORUS et al., 2017; PLAZAS et al., 2017; DAMICONE et al., 2018; JAMANN et al., 2019; LEITE et al., 2019), foi recentemente confirmada no Brasil (SAGATA et al., 2018; LEITE et al., 2019). Esta bactéria causa lesões necróticas que podem cobrir até 60% da área foliar, causa murcha da planta e, em locais onde a incidência da doença foi superior a 90%, a área foliar infectada ultrapassou 50% (QHOBELA; CLAFLIN; NOWELL, 1990; KORUS et al., 2017; LANG et al., 2017; LEITE JR et al., 2018; PLAZAS et al., 2018; ARIAS et al., 2020; ORTIZ-CASTRO et al., 2020).

Como medidas de controle da MBM, são indicados o uso de híbridos resistentes, sendo que, no plantio de cultivares suscetíveis, a utilização de fungicidas pertencentes aos grupos triazóis, estrobilurinas, benzimidazol e oxitetraciclina é uma forma de manejo (PEDRO et al., 2010). Para EBM, não há nenhum controle biológico ou químico disponível (LEITE JR et al., 2018), além disto, sabe-se que a palhada deixada na superfície do solo é fonte de inóculo para a próxima estação de cultivo (ORTIZ-CASTRO et al., 2020).

Antibióticos são comumente usados para proteger contra doenças bacterianas, porém a aplicação extensiva desses produtos pode levar ao desenvolvimento de bactérias patogênicas resistentes, além de impactos à saúde humana e meio ambiente (NEVES et al., 2021; PAVÃO et al., 2021). Diversos metais são utilizados como agentes antimicrobianos, tais como prata (Ag), ouro (Au), cobre (Cu), titânio (Ti) e zinco (Zn), por não induzirem resistência da mesma maneira que os antibióticos (KARASENKOV et al., 2015).

A síntese desses materiais na forma de NPs pode potencializar seu efeito antimicrobiano (KARASENKOV et al., 2015). O tamanho em escala nanométrica (1×10^{-9} m) e a maior área superfície/volume da NP confere maior reatividade, mobilidade e absorção (RIZWAN et al., 2017; RAJPUT et al., 2018). Diversos trabalhos mostram seu uso no controle de doenças em plantas causadas por *Pantoea ananatis* (MAMEDE et al., 2022), *Xanthomonas gardneri* (FRAGA et al., 2021), *Pseudomonas syringae* (ELSHARKAWY et al., 2020), *Liberibacter crescens* (NARANJO et

al., 2020), *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* e *P. syringae* (MAXWELL et al., 2020), *X. perforans* (LIAO et al., 2019), *X. axonopodis* pv. *citri* (BALLOTTIN et al., 2017), *X. oryzae* pv. *oryzae* (LIANG; YANG; CUI, 2017) e *X. citri* subsp. *citri* (GRAHAM et al., 2016).

Os mecanismos da atividade antibacteriana ainda não são totalmente explicados e as possíveis causas são a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) intracelular, degradação da membrana celular, alterações na permeabilidade da membrana, vazamento intracelular, liberação de compostos tóxicos e genotoxicidade (BALLOTTIN et al., 2017; WANG; HU; SHAO, 2017). NPs de ZnO (zinco) e de Ag (prata) estão entre as mais usadas devido ao seu amplo espectro antimicrobiano, sem criar resistência, toxicidade seletiva, opacidade, baixo custo e efeito mínimo em células humanas (ESPITIA et al., 2012; ANTUNES et al., 2013).

Considerando a necessidade de produtos alternativos no manejo de doenças bacterianas, os objetivos com estes trabalhos são avaliar o uso de NPs de ZnO, NiO e NPs de ZnO dopadas com Ag em aplicação preventiva e curativa no controle da MBM e da EBM.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LABAC) e em Casa de Vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

1 Preparo dos isolados

Os isolados de *Pantoea ananatis* (*P. ananatis*) - UFU A18 e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*X. vasicola* pv. *vasculorum*) - UFU J29 foram recuperados, multiplicados e cultivados em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24-48 horas a 28 °C. Após 48 horas, foi preparada suspensão bacteriana em água filtrada, calibrada em espectrofotômetro para $OD_{550} = 0,1$ (1×10^8 UFC mL⁻¹ para *X. vasicola* pv. *vasculorum* e 1×10^{10} UFC mL⁻¹ para *P. ananatis*). Posteriormente a suspensão de *P. ananatis* foi diluída para a concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹.

Foram realizadas inoculações individuais (*P. ananatis* ou *X. vasicola* pv. *vasculorum*) e em conjunto (*P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*), totalizando três ensaios: inoculação de *P. ananatis* em plantas de milho na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹; inoculação de *X. vasicola* pv. *vasculorum* em plantas de milho na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ e inoculação de *P. ananatis*+ *X. vasicola* pv. *vasculorum* em plantas de milho na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹.

2 Preparo das nanopartículas (NPs)

As NPs puras de ZnO e NiO assim como NPs dopadas com prata ZnO:0,7Ag, ZnO: 1,0Ag e ZnO:9,0Ag foram sintetizadas no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores, do Instituto de Física da UFU (Silva et al., 2018; Azevedo et al. 2018) e preparadas na dose de 2 mg mL⁻¹.

3 Condução, aplicação e avaliação

Foram realizados 2 ensaios no ano de 2022 em diferentes épocas (1º ensaio: 10 de junho a 16 de junho; 2º ensaio 20 de julho a 29 de julho). Os experimentos foram realizados em esquema fatorial (2x5+1) com 4 repetições, composto por 2 controles (preventivo e curativo), 5 produtos (NPs de ZnO, NiO, ZnO:0,7Ag, ZnO:1,0Ag e ZnO:9,0Ag) e dois adicionais (cobre comercial e água). O cobre comercial (2 mg mL⁻¹) contém 35% de Cu metálico na forma de hidróxido de cobre (Cu(OH)₂). O cobre comercial a 2 mg mL⁻¹ contém Cu a aproximadamente 0,7 mg mL⁻¹. Foi considerado como unidade experimental um vaso contendo 2 plantas.

Em casa de vegetação, plantas de milho do híbrido P3551 PW foram cultivadas em vasos com capacidade de 500 mL, contendo solo, areia e vermiculita (3:1:1). Após 15 dias da sementeira (estágio de 3 a 4 folhas), foi aplicado o controle preventivo, pulverizando as folhas até ponto de escorrimento com suspensões das NPs de ZnO, NiO, ZnO:0,7Ag, ZnO:1,0Ag e ZnO:9,0Ag, cobre comercial (2 mg mL⁻¹) ou água. Depois de 3 dias as plantas foram pulverizadas com a suspensão bacteriana (1x10⁸ UFC mL⁻¹). Na aplicação curativa as plantas foram pulverizadas com suspensão bacteriana e, após 3 dias, foram pulverizadas, com as soluções das NP, cobre ou água. As plantas foram mantidas em câmara úmida 24 horas antes e após a inoculação.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação até 15 dias após a inoculação para avaliação dos sintomas de MBM: - lesões foliares aquosas do tipo anasarca, com coloração verde-escuro que evoluem para necróticas e de cor palha; e para EBM - pontuações de 2-3 mm nas folhas que evoluem para lesões alongadas e estreitas circundadas por halo de coloração amarela, restritas às regiões internervais.

Foram realizadas 4 avaliações, que ocorreram de 3 em 3 dias. A severidade da mancha branca do milho (MBM) foi avaliada a partir de escala diagramática proposta por Malagi et al. (2011) (Figura 5.1). A severidade da estria bacteriana do milho (EBM) foi avaliada a partir de escala diagramática proposta por Braga et al. (2020) (Figura 5.2).



Figura 5.1. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha branca do milho, causada por *P. ananatis* (Malagi et al., 2011).

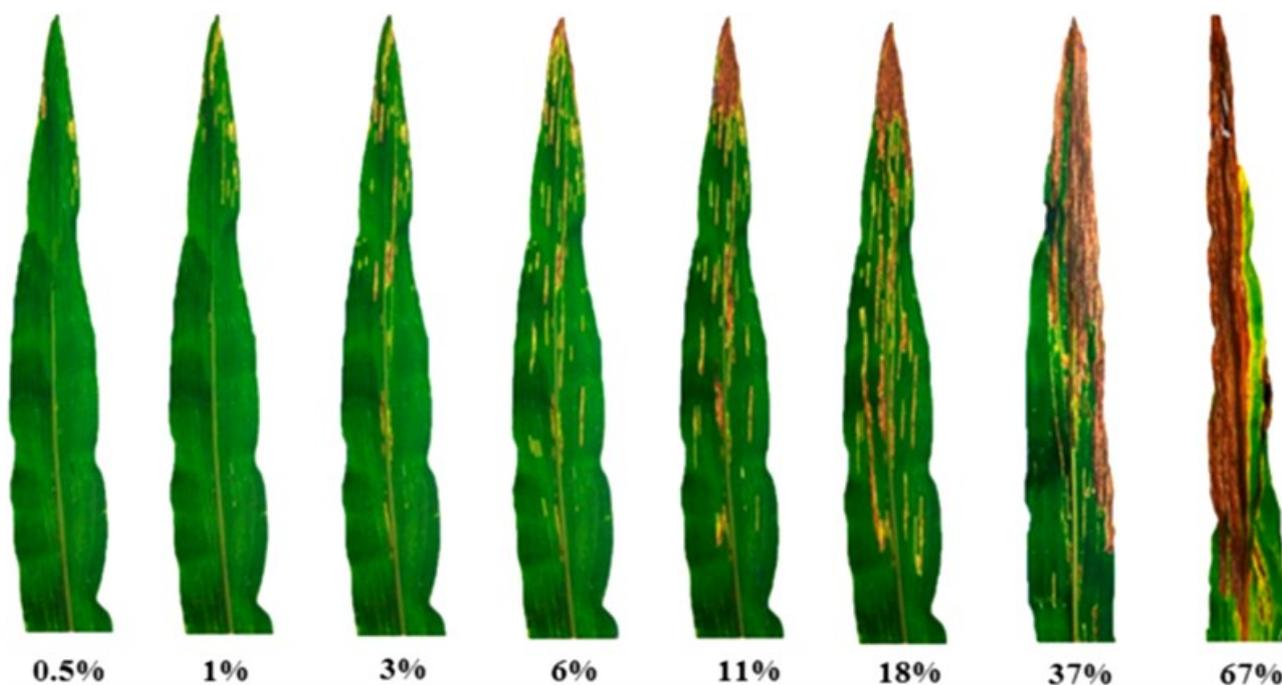


Figura 5.2. Escala diagramática para avaliação da severidade da estria bacteriana do milho, causada por *X. vasicola* pv. *vascolorum* (Braga et al., 2020).

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada pela fórmula: $AACPD = \sum ((Y_i + Y_{i+1})/2) (t_{i+1} - t_i)$, em que Y é a intensidade da doença; t é o tempo (intervalo entre as avaliações, em dias); e i é o número de avaliações feitas ao longo do tempo (SHANER; FINNEY, 1977).

4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott e teste de Dunnett a 5% de probabilidade usando R v 4.0.2 (R CORE TEAM, 2020).

RESULTADOS

As Tabelas 5.1 e 5.2 mostram a severidade da MBM e EBM a partir do cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em aplicações preventivas e curativas de diferentes NPs nos dois ensaios. As médias de AACPD foram significativas tanto para a forma de aplicação quanto para as diferentes NPs.

Tabela 5.1. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da mancha branca (MBM) e da estria bacteriana do milho (EBM), em aplicação preventiva e curativa com diferentes nanopartículas (NPs), ensaio 1.

Doença	Aplicação	NPs					Médias
		0,7Ag	1,0Ag	9,0Ag	NiO	ZnO	
MBM	Preventivo	18,53*	9,90	9,68	15,41	14,40	13,58B
	Curativo	2,48	2,48	2,06	9,49	4,95	4,29A
	Médias	10,50a	6,19a	5,87a	12,45a	9,68a	
	Cobre*		4,95				
	Controle+		9,90				
EBM	Preventivo	237,00+	180,00+	213,00+	70,88+	103,50+	160,88A
	Curativo	338,25*	237,00+	180,00+	110,25+	180,00+	209,10B
	Médias	287,63c	208,50b	196,50b	90,56a	141,75a	
	Cobre*		151,50				
	Controle+		372,00				
MBM	Preventivo	11,18	7,76	9,90	17,36	9,90	11,22B
	Curativo	4,95	4,95	4,95	4,95	9,90	5,94A
	Médias	8,06a	6,36a	7,43a	11,16a	9,90a	
	Cobre*		4,95				
	Controle+		17,40				
EBM	Preventivo	21,94Aa	16,69Aa	28,50Aa	9,94Aa	17,25Aa	18,86
	Curativo	44,63Aa	24,56Aa	22,31Aa	21,75Aa	97,50Bb*+	42,15
	Médias	33,28	20,63	25,41	15,84	57,38	
	Cobre*		24,56				
	Controle+		37,50				

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem pelo teste de Scott-Knott a 5%. */+ Difere pelo teste de Dunnett a 5%.

Tabela 5.2. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da mancha branca (MBM) e da estria bacteriana do milho (EBM), em aplicação preventiva e curativa com diferentes nanopartículas (NPs), ensaio 2.

Doença	Aplicação	NPs					Médias
		0,7Ag	1,0Ag	9,0Ag	NiO	ZnO	
MBM	Preventiva	16,65	17,96	9,49*	5,36*	9.90	11.87A
	Curativa	14,78	9,90	13,65	6,90*	14.18	11.88A
	Médias	15,71b	13,93b	11,57b	6,13a	12.04b	
	Cobre*		20,59				
	Controle+		9,90				
EBM	Preventiva	372,00Ba	569,25Bb*+	468,00Bb*	203,25Aa	304.50Aa	383.40
	Curativa	218,63Aa	251,25Aa	306,00Aa	256,50Aa	603.00Bb*+	327.08
	Médias	295,31	410,25	387,00	229,88	453.75	
	Cobre*		280,88				
	Controle+		333,00				
MBM	Preventiva	8,55	11,03	12,90	6,60	9.90	9.80A
	Curativa	9,45	7,43	7,43	4,95	9.90	7.83A
	Médias	9,00a	9,23a	10,16a	5,78a	9.90a	
	Cobre*		11,03				
	Controle+		9,90				
EBM	Preventiva	70,88	208,13	174,94	153,56	99.37	141.37B
	Curativa	71,63	102,75	44,06	63,56	88.06	74.01A
	Médias	71,25a	155,44a	109,50a	108,56a	93.72a	
	Cobre*		59,25				
	Controle+		78,75				

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem pelo teste de Scott-Knott a 5%. */+ Difere pelo teste de Dunnett a 5%.

Para a MBM, causada por *P. ananatis*, em nenhum dos ensaios houve interação significativa entre as NPs e as aplicações preventivas e curativas (Tabelas 5.1 e 5.2). No ensaio 1 houve redução da severidade da doença na aplicação curativa, com resultados satisfatórios para todas as NPs, visto que a AACPD foi a menor (4,29). Enquanto no ensaio 2 as aplicações no preventivo (11,87) ou curativo (11,88) resultaram em médias de AACPD semelhantes. Apesar da aplicação das NPs se assemelharem à aplicação da água para ambos ensaios, observa-se que no ensaio 1, as NPs de ZnO:1,0Ag (6,19) e ZnO:9,0Ag (5,87), e no ensaio 2, a NP de NiO (6,13), reduziram a severidade da MBM com menor AACPD que o controle (9,90).

Quanto à aplicação de cobre, problemas de fitotoxidez levaram à discrepância entre a AACPD do ensaio 1 (4,95) e do ensaio 2 (20,59). No ensaio 1, houve queima das folhas o que dificultou as

avaliações da doença. Já no ensaio 2, sem queima das folhas, a severidade da doença foi maior (20,59) até que o controle (9,90) e diferiu das NPs de ZnO:9,0Ag (9,49) e de NiO (5,36 e 6,90), na aplicação preventiva. Trabalhos anteriores já relataram que produtos a base de hidróxido de cobre e oxiclreto de cobre, usados no controle de *P. ananatis*, tiveram efeito fitotóxico em plantas de milho (BOMFETI et al., 2007). Esses dados demonstram que a aplicação de cobre mesmo na dosagem recomendada pode auxiliar na entrada e estabelecimento da bactéria, aumentando a severidade da MBM.

Para a EBM, causada por *X. vasicola* pv. *vasculorum*, no ensaio 1, não houve interação significativa entre as NPs e as aplicações (Tabela 5.1). Já no ensaio 2 houve interação significativa, ou seja, existe uma dependência entre a NP usada e o método de aplicação (Tabela 5.2). No ensaio 1, a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a estria bacteriana do milho (EBM) apresentou menor severidade da doença nas aplicações preventivas das NPs (160,88) e as NPs de NiO (90,56) e ZnO (141,75) reduziram a severidade da doença e, no ensaio 2, a NP de NiO, pode ser usada tanto em aplicações preventivas (203,25) como curativas (256,50) pois apresentou a menor AACPD.

Em contrapartida, no ensaio 2, em aplicação curativa, a NP de ZnO (603,00) foi a que apresentou a maior AACPD, diferindo significativamente do controle (333,00). As NPs de Ag (0,7; 1,0 e 9,0), apesar das altas médias de severidade da EBM nas aplicações preventivas, quando usadas em aplicações curativas podem ser alternativa para o controle da doença com destaque para as NPs de ZnO:0,7Ag (218,63). Resultados semelhantes foram encontrados por Ocsoy et al. (2013), usando NPs de Ag no controle de *Xanthomonas perforans* na cultura do tomate. Em baixas concentrações, as NPs de Ag apresentaram excelente atividade antibacteriana e sua aplicação em casa de vegetação reduziu significativamente a severidade da mancha bacteriana.

A aplicação de cobre (151,50 e 280,88), em ambos os ensaios, reduziu a severidade da EBM. Resultados semelhantes foram encontrados por Fraga et al. (2021) que observaram redução na AACPD ao avaliar o controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas* spp.) a partir da aplicação de hidróxido de cobre. A maioria das NPs são alternativa para o controle da EBM pois se assemelharam a aplicação do hidróxido de cobre, exceto NP de 0,7Ag (338,25) no ensaio 1 e as NPs de 1,0Ag (569,25) e 9,0Ag (468,00) no ensaio 2.

Quando inoculadas conjuntamente, *P. ananatis* e *X. vasicola* pv. *vasculorum* apresentaram redução da severidade das doenças em comparação a inoculação individual (Tabela 5.1 e Tabela 5.2), principalmente a EBM. Nos ensaios observa-se que, para *P. ananatis*, não houve interação significativa entre as NPs, nas aplicações preventiva ou curativa, visto que no ensaio 1 a aplicação curativa (5,94) reduziu a severidade da MBM e, no ensaio 2, não houve diferença entre as aplicações

preventiva (9,80) e curativa (7,83). Apesar da semelhança com a aplicação de água em ambos ensaios, todas as NPs reduziram a severidade da MBM no ensaio 1 e no ensaio 2, e a NP de NiO (5,78) obteve a menor média de severidade da doença no ensaio 2.

Quanto a *X. vasicola* pv. *vasculorum*, no ensaio 1 houve interação significativa e todas as NPs reduziram a severidade da EBM. Apenas a NP de ZnO na aplicação curativa (97,50) diferiu das demais com maior severidade, inclusive em comparação ao controle (37,50). No ensaio 2 não houve interação significativa, com menor severidade da doença para aplicação curativa (74,01) independente da NP usada.

O cobre reduziu a severidade da EBM em ambos ensaios (24,56 e 59,25), porém no ensaio 2 houve aumento da severidade da MBM (11,03). O que corrobora o fato de que a aplicação de cobre reduz a EBM enquanto auxilia no estabelecimento de *P. ananatis* e aumenta a severidade da MBM.

Em plantas cultivadas, como o milho, as manchas foliares são doenças de ocorrência amplamente distribuída que provocam prejuízos na lavoura e, como consequência, na produtividade da cultura. Os danos causados por essas doenças são decorrentes do mal funcionamento de células e tecidos fotossintéticos devido ao aumento do número de lesões infecciosas e posterior expansão da área foliar necrosada (AGRIOS, 2005). Em geral seus sintomas são de fácil observação e mudam muito em função do agente causal (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Nem sempre é possível visualizar sinais do patógeno e alguns sintomas podem se confundir em função do agente causal (AGRIOS, 2005). Tanto a *P. ananatis* como a *X. vasicola* pv. *vasculorum* penetram no hospedeiro via aberturas naturais, como estômatos ou ferimentos e seus sintomas podem ser observados nos estágios iniciais em folhas jovens e, conforme sua evolução, nas brácteas das espigas (OLIVEIRA et al., 2004; BABA et al., 2008; SILVA; COTA; COSTA, 2015; LEITE JR et al., 2018).

NPs metálicas têm apresentado efeitos benéficos em plantas, com a ativação de mecanismos de defesa e de absorção de micronutrientes (CARTWRIGHT et al., 2020). NPs de ZnO podem interagir com a superfície bacteriana e/ou com o núcleo bacteriano exibindo mecanismos bactericidas distintos: alteração da viscosidade e estrutura da membrana celular que aumentam sua permeabilidade (HOU et al., 2018; SIDDIQI et al., 2018), danos a parede celular que contribuem para a entrada de compostos tóxicos no citoplasma (CZYŻOWSKA; BARBASZ, 2020) e indução de resistência da planta (ELSHARKAWY et al., 2020). NPs de NiO já foram usadas com sucesso como bactericidas tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e, também, contra fungos como

Colletotricum e *Fusarium* nas culturas da pimenta, alface e tomate (FATIMA; HASHIM; ANEES, 2021).

A ação antibacteriana da Ag é bem conhecida pois íons de Ag possuem propriedades inibidoras, bactericidas e antimicrobianas de alto espectro (LARA et al., 2010). Araújo et al. (2015) observaram que NPs de Ag são uma alternativa eficiente na descontaminação de cenouras sobre mesófilos aeróbios, *Pseudomonas* ssp., e coliformes; Ballottin et al. (2017) relataram forte atividade de NPs de Ag nas membranas de *Candida parapsilosis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, em fibras de algodão impregnadas com suspensão da NP mesmo após repetidos ciclos de lavagem mecânica.

Observou-se que o aumento da concentração das NPs de ZnO:Ag (0,7, 1,0 e 9,0) não alterou sua atividade antibacteriana. Semelhante ao encontrado por Rivas-Cáceres et al. (2018) que ao investigar o uso de NPs de Ag em diferentes concentrações (0, 12, 24, 48, 84 e 120 µg) contra a propagação da infecção por *Clavibacter michiganensis* em *Lycopersicon esculentum* Mill percebeu que a concentração de 84 µg foi eficiente e que seu aumento não alterava a atividade antibacteriana da NP.

Quando já estabelecidas, no campo, as doenças são de difícil controle e encontrar formas de manejo que possibilitem a redução dos danos de ambas é abordagem necessária. No presente trabalho observou-se que a EBM foi mais agressiva que a MBM e que, para os dois patógenos, aplicações curativas tiveram melhor desempenho e reduziram a severidade das doenças. Além disso, este estudo mostra pela primeira vez que NPs de ZnO dopadas com Ag em diferentes concentrações, e NiO reduziram a severidade da MBM e da EBM, podendo ser usadas no manejo das doenças.

CONCLUSÕES

NPs de ZnO dopadas com Ag em diferentes concentrações e NPs de NiO reduziram a severidade da mancha branca e da estria bacteriana do milho em aplicações preventivas e curativas.

O hidróxido de cobre aumentou a severidade da mancha branca e reduziu a severidade da estria bacteriana do milho.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier : Academic Press, 2005.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011.

ANTUNES, F. *et al.* Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 20–26, out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.4013/ete.2013.91.03>. Disponível em: <https://revistas.unisinos.br/>. Acesso em 21 jun. 2023.

ARIAS, S. L. *et al.* Occurrence in Seeds and Potential Seed Transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Maize in the United States. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1139–1146, march. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-19-0306-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-08-19-0306-R#>. Acesso em 15 jun 2023.

BABA, V. Y. *et al.* Diferenças na anatomia foliar em plantas resistentes e suscetíveis à mancha branca do milho. In: XVII EAIC, 2008. **Anais eletrônicos** [...]. [Londrina]: 2008. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/491671/diferencas-na-anatomia-foliar-em-plantas-resistentes-e-suscetiveis-a-mancha-branca-do-milho>. Acesso em 21 jun. 2023.

BALLOTTIN, D. *et al.* Antimicrobial textiles: Biogenic silver nanoparticles against *Candida* and *Xanthomonas*. **Materials Science and Engineering: C**, Campinas, v. 75, p. 582–589, jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.110>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116320070?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

BRAGA, K. *et al.* Development and validation of a diagrammatic scale for the assessment of the severity of bacterial leaf streak of corn. **Plant Pathology**, [s. l.], v. 157, p. 367-375, mai. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02008-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-020-02008-7>. Acesso em 20 jun. 2023.

BOMFETI, C. A. *et al.* 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**, [s. l.], v. 33, p. 63–67, mar. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100->

[54052007000100009](https://doi.org/10.54052/0070001000009).

Disponível

em:

<https://www.scielo.br/j/sp/a/6pZfXcrpQwcFRQCKTS6h9zm/?lang=pt>. Acesso em 21 jun. 2023.

CARTWRIGHT, A. *et al.* A Review of Metal and Metal-Oxide Nanoparticle Coating Technologies to Inhibit Agglomeration and Increase Bioactivity for Agricultural Applications. **Agronomy**, Logan, v. 10, n. 7, p. 1018, 15 jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10071018>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/10/7/1018>. Acesso em 21 jun. 2023.

CZYŻOWSKA, A.; BARBASZ, A. A review: zinc oxide nanoparticles – friends or enemies? **International Journal of Environmental Health Research**, Kraków, p. 1–17, 10 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1805415>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09603123.2020.1805415>. Acesso em 21 jun. 2023.

ELSHARKAWY, M. *et al.* Zinc oxide nanostructures as a control strategy of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas syringae* in Egypt. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 27, n. 16, p. 19049–19057, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3806-0>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-018-3806-0>. Acesso em 21 jun. 2023.

ESCANFERLA, M. E. *et al.* Viability and dissemination of *Pantoea ananatis*, etiological agent of Maize White Spot disease. **Agronomy, Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 7, 2018. DOI: <https://doi.org/10.33158/ASB.2018v4i2p52>. Disponível em: <https://www.mecenaspublishing.com/journals/index.php/asbjournal/article/view/65>. Acesso em 21 jun. 2023.

ESPITIA, P. J. P. *et al.* Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 1447–1464, jul. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0797-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-012-0797-6>. Acesso em 21 jun. 2023.

FATIMA, F.; HASHIM, A.; ANEES, S. Efficacy of nanoparticles as nanofertilizer production: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 1292–1303, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11218-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-020-11218-9>. Acesso em 21 jun. 2023.

FRAGA, F. S. *et al.* Doped zinc-oxide nanocrystals for the control of tomato bacterial spot and *Xanthomonas gardneri* in seeds. **Tropical Plant Pathology**, Uberlândia, v. 46, p. 406-413, mai. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00436-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40858-021-00436-2>. Acesso em 21 jun. 2023.

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 2, p. 209–215, jun. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000200017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/fb/a/QS37wLdvDNHhDyPrB78wTnM/?lang=pt>. Acesso em 21 jun. 2023.

GRAHAM, J. H. *et al.* Potential of Nano-Formulated Zinc Oxide for Control of Citrus Canker on Grapefruit Trees. **Plant Disease**, Orlando, v. 100, n. 12, p. 2442–2447, dez. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0598-RE>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-05-16-0598-RE>. Acesso em 22 jun. 2023.

HARTMAN, T. *et al.* Alternative Hosts in the Families Poaceae and Cyperaceae for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, Causal Agent of Bacterial Leaf Streak of Corn. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1147–1152, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-19-0132-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-04-19-0132-R>. Acesso em 22 jun. 2023.

HOU, J. *et al.* Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms. **Chemosphere**, Beijing, v. 193, p. 852–860, fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.077>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653517318544?via%3Dihub>. Acesso em 21 jun. 2023.

KARASENKOV, Y. *et al.* Colloidal metal oxide nanoparticle systems: the new promising way to prevent antibiotic resistance during treatment of local infectious processes. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [s. l.], v. 98, p. 012038, nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012038>. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/98/1/012038>. Acesso em 21 jun. 2023.

KORUS, K. *et al.* First Report of *Xanthomonas vasicola* Causing Bacterial Leaf Streak on Corn in the United States. **Plant Disease**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 1030, jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1426-PDN>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-16-1426-PDN>. Acesso em 16 de jun. 2023.

LANG, J. M. *et al.* Detection and Characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. Causing Bacterial Leaf Streak of Corn in the United States. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 107, n. 11, p. 1312–1321, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0168-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-05-17-0168-R>. Acesso em 16 jun. 2023.

LEITE JR, R. P. *et al.* Estria Bacteriana do Milho no Paraná. **Informe da Pesquisa**, Londrina, n. 160, p. 7-18, jul. 2018.

LEITE, R. P. *et al.* First Report of the Occurrence of Bacterial Leaf Streak of Corn Caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 145–145, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1100-PDN>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-06-18-1100-PDN>. Acesso em 17 jun. 2023.

LIANG, Y.; YANG, D.; CUI, J. A graphene oxide/silver nanoparticle composite as a novel agricultural antibacterial agent against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* for crop disease management. **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 41, n. 22, p. 13692–13699, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7NJ02942J>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/NJ/C7NJ02942J>. Acesso em 22 jun. 2023.

LIAO, Y.-Y. *et al.* Nano-Magnesium Oxide: A Novel Bactericide Against Copper-Tolerant *Xanthomonas perforans* Causing Tomato Bacterial Spot. **Phytopathology**®, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 52–62, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-18-0152-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-05-18-0152-R>. Acesso em 22 jun. 2023.

MALAGI, G. *et al.* Elaboração e validação da escala diagramática para avaliação da mancha branca do milho. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 42, n.3, p. 797-804, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902011000300028> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rca/a/zgd6TR6tqtjkh7GQ4LBHNNQ/?lang=pt>. Acesso em 20 jun. 2023

MAMEDE, M. C. *et al.* Nanoparticles in inhibiting *Pantoea ananatis* and to control maize white spot. **Ciência Rural**, Uberlândia, v. 52, n. 7, p. e20210481, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210481>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/bqm4S6YrG3Bqyh8YBj8SR8B/?lang=en>. Acesso em 21 jun. 2023.

MAXWELL, T. J. *et al.* Non-phytotoxic zinc based nanoparticle adjuvant for improving rainfastness and sustained release of streptomycin. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, Orlando, v. 14, p. 100355, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100355>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2215153220303378?via%3Dihub>. Acesso em 22 jun. 2023.

NARANJO, E. *et al.* Zinkicide Is a ZnO-Based Nanoformulation with Bactericidal Activity against *Liberibacter crescens* in Batch Cultures and in Microfluidic Chambers Simulating Plant Vascular Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 16, p. e00788-20, ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00788-20>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00788-20>. Acesso em 22 jun. 2023.

NEVES, M. L. DA R. *et al.* A influência do quórum sensing na formação do biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. e33910212659–e33910212659, fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12659>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12659>. Acesso em 21 jun. 2023.

OCSOY, I. *et al.* Nanotechnology in Plant Disease Management: DNA-Directed Silver Nanoparticles on Graphene Oxide as an Antibacterial against *Xanthomonas perforans*. **ACS Nano**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 8972–8980, out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn4034794>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn4034794>. Acesso em 22 jun. 2023.

OLIVEIRA, E. D. *et al.* **Diagnose e controle de doenças na cultura do milho**. Em: Tecnologias de produção do milho. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 366.

ORTIZ-CASTRO, M. *et al.* Current Understanding of the History, Global Spread, Ecology, Evolution, and Management of the Corn Bacterial Leaf Streak Pathogen, *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. **Phytopathology**®, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1124–1131, 9 abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-20-0018-PER>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-01-20-0018-PER>. Acesso em 17 jun. 2023.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *et al.* Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Sete Lagoas, v. 149, n. 5, p. 275–279, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>. Acesso em 19 jun. 2023.

PAVÃO, D. P. E *et al.* Capacidade de formação de biofilme por cepas bacterianas e ação antibiofilme do extrato de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). **Revista Fitos**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 153–165, 30 jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.32712/2446-4775.2021.1073>. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/1073>. Acesso em 21 jun. 2023.

PINTO, N. 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. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 1007–1010, 1999.

PLAZAS, M. C. *et al.* First Report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* Causing Bacteria Leaf Streak of Maize (*Zea mays*) in Argentina. **Plant Disease**, [s. l.], v. 102, n. 5, p. 1026–1026, maio 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1578-PDN> . Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-17-1578-PDN>. Acesso em 17 jun. 2023.

QHOBELA, M.; CLAFLIN, L. E.; NOWELL, D. C. Evidence that *Xanthomonas campestris* pv. *zeae* can be distinguished from other pathovars capable of infecting maize by restriction fragment length polymorphism of genomic DNA. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 183–186, jun. 1990. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060669009501024> . Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07060669009501024>. Acesso em 17 jun. 2023.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 07 jul. 2023.

RAJPUT, V. D. *et al.* Effects of Copper Nanoparticles (CuO NPs) on Crop Plants: a Mini Review. **BioNanoScience**, Rostov, v. 8, n. 1, p. 36–42, mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0466-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12668-017-0466-3>. Acesso em 22 jun. 2023.

RIZWAN, M. *et al.* Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. **Elsevier Enhanced Reader**, [s. l.], v. 322, n. 322, p. 2–16, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.061>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030438941630499X?via%3Dihub>. Acesso em 22 jun. 2023.

SHANER G.; FINNEY R. E. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathology**, [s. l.], v. 67, p. 1051-1056, 1977. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-67-1051>. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Abstracts/Phyto67_1051.htm. Acesso em 07 jul. 2023.

SIDDIQI, K. S. *et al.* Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 141, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2532-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s11671-018-2532-3>. Acesso em 22 jun. 2023.

SILVA, D. D.; COTA, L. V.; COSTA, R. V. Cultivo do Milho: Doenças. **Embrapa Milho e Sorgo**, 2015. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaof6_lga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7905&p_r_p_-996514994_topicoId=8666. Acesso em 22 jun. 2023.

WANG, L.; HU, C.; SHAO, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. **International Journal of Nanomedicine**, [*s. l.*], v. 12, p. 1227–1249, fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/the-antimicrobial-activity-of-nanoparticles-present-situation-and-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em 22 jun. 2023.

APÊNDICE 1 - Protocolo dos meios de cultura

1. Meio 523

Água destilada.....	1000mL
Sacarose.....	10g
Extrato de levedura.....	4g
Caseína ácida hidrolisada.....	8g
K ₂ HPO ₄ (anidro).....	2g
MgSO ₄	0,3g
Ágar.....	20g

2. Meio TSA

Água destilada.....	1000mL
Soybean casein.....	40g

3. Meio NA

Água destilada.....	1000mL
Peptona.....	5g
Extrato de carne.....	3g
Ágar.....	15g

4. Meio YDC

Água destilada.....	1000mL
Extrato de levedura.....	10g
Carbonato de cálcio.....	20g
*Glicose/Dextrose.....	20g
Ágar.....	15g

*adicionar glicose/dextrose após autoclavagem, com o meio fundido e em ponto de mamadeira.

5. Meio PSA

Água destilada.....	1000mL
---------------------	--------

Peptona.....10g
Sacarose.....10g
Ágar.....16g

6. Meio XTS

Água destilada.....1000mL
Glicose.....5g
Peptona.....5g
Extrato de carne.....3g
Ágar.....15g