**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito do Acibenzolar-S-metílico e filtrado da suspensão de células de
Streptomyces scabies na indução de resistência de plantas de milho ao
enfazamento vermelho causado por fitoplasma**

Cláudia Alves de Almeida

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2020**

Cláudia Alves de Almeida
Engenheira Agrônoma

Efeito do Acibenzolar-S-metílico e filtrado da suspensão de células de *Streptomyces scabies* na indução de resistência de plantas de milho ao enfezamento vermelho causado por fitoplasma

Orientador:
Prof. Dr. **IVAN PAULO BEDENDO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Almeida, Cláudia Alves de

Efeito do Acibenzolar-S-metílico e filtrado da suspensão de células de *Streptomyces scabies* na indução de resistência de plantas de milho ao enfezamento vermelho causado por fitoplasma / Cláudia Alves de Almeida.
- - Piracicaba, 2020.

103 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Zea mays* 2. Mollicutes 3. *Dalbulus maidis* 4. Alterações bioquímicas
5. Controle alternativo I. Título

DEDICATÓRIA

A Deus

Pelo dom da vida e por me capacitar com todas as bençãos necessárias à caminhada.

A meus amados pais José Maria e Maria pelo amor, força, orações, incentivo aos estudos e
por terem acreditado no meu sonho!

Ao meu irmão Flávio, pelo apoio e carinho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À minha família por todo incentivo, amor e carinho ao longo da minha interminável jornada. Sem vocês, esta conquista não teria sido alcançada.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia (LFN), pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Ivan Paulo Bedendo, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade e amizade.

Ao professor Sérgio Florentino Pascholati, pelas valiosas contribuições e pela disposição em auxiliar.

Ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fisiológica da ESALQ/USP pelas facilidades concedidas para a execução das análises bioquímicas.

Ao Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos que concederam os insetos para a montagem dos ensaios.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-graduação de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP, que compartilharam seus conhecimentos e não mediram esforços para nos ensinar.

Agradeço a todos do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, colegas e amigos, pela convivência diária, companheirismo e aprendizado.

Agradeço a todos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica

A todos os professores, funcionários e alunos do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À família Alcântara pelo carinho, apoio e pelos bons momentos vividos durante a minha caminhada. Muito obrigada!

Aos amigos queridos do Ministério Universidades Renovadas da diocese de Piracicaba, que, de uma forma ou de outra, contribuíram para alegrar meu dia a dia, sempre dedicados e companheiros, me estimulando a completar a trajetória e me mostrando que, sem Deus, nada sou! Agradeço e homenageio a todos.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DO FILTRADO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS DE <i>Streptomyces scabies</i> E DO ACIBENZOLAR-S-METÍLICO NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM MILHO AO FITOPLASMA DO ENFEZAMENTO.....	26
3.1.1. Local do ensaio e delineamento experimental	26
3.1.2. Obtenção das plantas de milho.....	27
3.1.3. Obtenção do filtrado da suspensão de células (FSC) de <i>Streptomyces scabies</i>	27
3.1.4. Acibenzolar-S-metílico	28
3.1.5. Aplicação do filtrado da suspensão de células (FSC) e do acibenzolar-S-metílico (ASM).....	28
3.1.6. Obtenção das populações infectivas e não infectiva do vetor <i>Dalbulus maidis</i>	28
3.1.7. Inoculação experimental das plantas com o fitoplasma.....	29
3.1.8. Isolamento de DNA genômico de plantas de milho	29
3.1.9. Detecção do fitoplasma por duplo PCR.....	30
3.1.10. Identificação do fitoplasma por PCR com primers específicos para o grupo 16SrI.....	31
3.1.11. Análises bioquímicas	32
3.1.11.1. Obtenção e armazenamento das amostras de tecido foliar.....	32
3.1.11.2. Determinação do conteúdo de clorofila total	32
3.1.11.3. Quantificação de proteínas totais e atividade de guaiacol peroxidase	33
3.1.11.3.1. Obtenção do extrato protéico	33
3.1.11.3.2. Quantificação de proteínas totais	33
3.1.11.3.3. Atividade de guaiacol peroxidase	33
3.1.11.4. Quantificação de açúcares redutores	34
3.1.11.5. Quantificação de fenóis livres e ligados.....	34
3.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO DO FILTRADO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS (FSC) DA BACTÉRIA <i>S. scabies</i> E DO PRODUTO COMERCIAL ACIBENZOLAR-	

S-METÍLICO (ASM) NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE PLANTAS DE MILHO INFECTADAS COM O FITOPLASMA DO ENFEZAMENTO VERMELHO, EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO.....	35
3.2.1. Avaliação das variáveis de crescimento e produtividade do milho.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DO FILTRADO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS (FSC) DE <i>Streptomyces Scabies</i> E DO ACIBENZOLAR-S-METÍLICO NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.) AO ENFEZAMENTO VERMELHO.....	38
4.1.1. Sintomatologia das plantas de milho.....	38
4.1.2. Detecção e identificação do fitoplasma.....	39
4.1.3. Alterações bioquímicas em plantas de milho híbrido suscetível MG300 pulverizadas com o ASM ou com o FSC de <i>S. scabies</i> e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho.....	42
4.1.3.1. Conteúdo de clorofila total.....	42
4.1.3.2. Conteúdo de açúcares redutores.....	46
4.1.3.3. Conteúdo de fenóis livres e ligados.....	51
4.1.3.4. Conteúdo de proteínas totais.....	60
4.1.3.5. Atividade da enzima guaiacol peroxidase.....	66
4.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO DO FILTRADO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS (FSC) DA BACTÉRIA <i>Streptomyces scabies</i> E DO PRODUTO COMERCIAL ACIBENZOLAR-S-METÍLICO (ASM) NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE PLANTAS DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.) INFECTADAS COM O FITOPLASMA DO ENFEZAMENTO VERMELHO	70
4.2.1. Impacto da aplicação de indutores de resistência no crescimento e na produção de plantas de milho.....	70
4.2.2. Efeito do ASM e do FSC de <i>S. scabies</i> na altura de plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho	71
4.2.3. Efeito do ASM e do FSC de <i>S. scabies</i> no número de folhas por plantas, em plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho.....	73
4.2.4. Efeito do ASM e do FSC de <i>S. scabies</i> no diâmetro do caule em plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho.....	74
4.2.5. Efeito do ASM e do FSC de <i>S. scabies</i> na massa seca das folhas produzidas por plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho	75

4.2.6. Efeito do ASM e do FSC de <i>S. scabies</i> na massa seca do caule de plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho	77
4.2.7. Efeito do ASM e do FSC de <i>S. scabies</i> na massa seca do sistema radicular de plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho	78
4.2.8. Efeito do ASM e do FSC de <i>S. scabies</i> na massa seca das espigas, massa seca de sementes e massa seca de sabugos produzidos por plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho	80
4.2.9. Efeito do ASM e do FSC de <i>S. scabies</i> no número de espigas por planta, comprimento e diâmetro da espiga em plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho	83
5. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90

RESUMO

Efeito do Acibenzolar-S-metílico e filtrado da suspensão de células de *Streptomyces scabies* na indução de resistência de plantas de milho ao enfezamento vermelho causado por fitoplasma

O enfezamento vermelho, causado por fitoplasma transmitido pela cigarrinha vetora *Dalbulus maidis* L, é considerado uma das principais doenças do milho no Brasil. Tendo em vista as dificuldades de manejo da doença nas áreas de plantio, medidas alternativas para somar às estratégias já existentes são desejáveis. Neste contexto, a ativação de mecanismos de defesa latentes, existentes nas plantas em resposta ao tratamento com substâncias eliciadoras, tem se mostrado uma alternativa promissora. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial do Acibenzolar-S-metílico (ASM) e do filtrado da suspensão de células de *Streptomyces scabies* (FSC) na indução da resposta de defesa de plantas de milho híbrido ao fitoplasma do enfezamento vermelho. Os ensaios consistiram de dois experimentos conduzidos em casa de vegetação. Os indutores foram aplicados nas plantas via foliar, aos oito dias após a semeadura. Após 48 h, as plantas foram inoculadas com o fitoplasma por meio do vetor *D. maidis*. No primeiro experimento, foram avaliadas alterações bioquímicas nas plantas por meio da determinação do teor de clorofila total, açúcares redutores, fenóis livres e ligados, proteínas totais e atividade da enzima peroxidase. As avaliações foram realizadas 0, 20, 40, 80 e 100 dias após a aplicação dos potenciais indutores. Além disto, verificou-se por meio da PCR, possíveis atrasos na detecção do fitoplasma nas plantas infectadas. No segundo experimento, avaliou-se o efeito da aplicação dos indutores no crescimento e na produção de plantas de milho determinando-se a altura de plantas (cm), número de folhas por planta, diâmetro do caule (cm), massa seca das folhas (g), massa seca do caule (g), massa seca da raiz (g), massa seca da espiga (g), massa seca das sementes (g), massa seca do sabugo (g), número de espigas por planta, comprimento da espiga (cm) e diâmetro da espiga (cm). Os dados revelaram que o uso do ASM ou FSC não provocou atraso na detecção do fitoplasma nas plantas de milho em relação ao controle. Houve aumento no conteúdo de açúcares redutores, fenóis livres e ligados em plantas tratadas e inoculadas com o fitoplasma. Por outro lado, houve redução no conteúdo de clorofila total. Um aumento significativo no conteúdo de proteínas totais foi observado nas plantas tratadas com o ASM, inoculadas ou não com o patógeno. Na atividade da enzima peroxidase, um aumento significativo somente foi observado quando o FSC foi aplicado nas plantas, sem a inoculação do fitoplasma. Com base nos resultados, infere-se que o bloqueio dos vasos do floema devido ao acúmulo de açúcares redutores nas folhas de plantas infectadas pelo fitoplasma, provavelmente interferiu nas respostas de defesa, pois mesmo havendo um aumento no conteúdo de fenóis livres e ligados e no conteúdo de proteínas e peroxidase, estas mudanças não foram suficientes para inibir os efeitos da doença. Sintomas típicos de enfezamento vermelho em plantas inoculadas foram observados, mesmo em plantas tratadas com os indutores. Com relação às variáveis de crescimento e produção, a aplicação dos indutores não reduziu os efeitos negativos provocados pela doença. Conclui-se que as mudanças bioquímicas observadas com a aplicação do ASM ou do FSC, em plantas inoculadas, não foram muito distintas das mudanças observadas em plantas que foram apenas inoculadas com o patógeno.

Palavras-chave: *Zea mays*, Mollicutes, *Dalbulus maidis*, Alterações bioquímicas, Controle alternativo

ABSTRACT

Effect of Acibenzolar-S-methyl and filtrate from the suspension of *Streptomyces scabies* cells on the induction of resistance of corn plants to maize bushy stunt caused by phytoplasma

Maize bushy stunt, caused by phytoplasma transmitted by the leafhopper vector *Dalbulus maidis* L., is considered one of the main diseases of corn in Brazil. In view of the difficulties in managing the disease in the planting areas, additional alternative measures to complement those already known are desirable. In this context, the activation of latent defense mechanisms existing in plants in response to treatment with eliciting substances, has shown to be a promising alternative. The main objective of this study was to evaluate the potential of Acibenzolar-S-methyl (ASM) and the filtrate of the cell suspension of *Streptomyces scabies* (FSC) in inducing the defense response of a susceptible hybrid corn to the maize bushy stunt phytoplasma. The tests consisted of two experiments conducted in a greenhouse. The inducers were applied on the leaves, eight days after sowing. After 48 h, the plants were inoculated with the phytoplasma using the vector *D. maidis*. In the first experiment, biochemical changes in corn plants were evaluated through the content of total chlorophyll, reducing sugars, free and bound phenols, total proteins and peroxidase enzyme activity at 0, 20, 40, 80 and 100 days after treatment with the inducers. In addition, possible delays in the detection of phytoplasma in plants were verified through PCR. In the second experiment, the effect of the application of inducers on the growth and production of corn plants was evaluated by plant height (cm), number of leaves per plant, stem diameter (cm), dry leaf mass (g), dry mass of stem (g), dry mass of roots (g), dry mass of ear (g), dry mass of seeds (g), dry mass of cob (g), number of ears per plant, ear length (cm) and ear diameter (cm). The findings revealed that the use of ASM or FSC did not cause delay in the detection of phytoplasma in corn plants in relation to the control. There was an increase in the content of reducing sugars, free and bound phenols in plants treated and inoculated with phytoplasma. On the other hand, there was a reduction in the total chlorophyll content. A significant increase in the total protein content was observed in the plants treated with ASM, inoculated or not with the pathogen. In the activity of the peroxidase enzyme, a significant increase was only observed when the FSC was applied to the plants, without the inoculation of the phytoplasma. It is inferred that the blocking of phloem vessels, observed through the accumulation of reducing sugars in the leaves of plants infected by phytoplasma, probably interfered in the defense responses because, even with an increase in the content of free and bound phenols, in proteins and peroxidase, these changes were not enough to inhibit the effects of the disease. Typical symptoms of maize bushy stunt in plants inoculated were observed, even in plants treated with inducers. Regarding growth and production variables, the application of inducers did not reduce the negative effects caused by the disease. Regarding growth and production variables, treatment with inducers did not reduce the negative effects caused by the pathogen. In conclusion, the biochemical changes observed in plants treated with ASM or FSC and inoculated with phytoplasma were not very different from those observed in plants that were only inoculated with the pathogen.

Keywords: *Zea mays*, Mollicutes, *Dalbulus maidis*, Biochemical changes, Alternative control

1. INTRODUÇÃO

Originário do México e da América Central, pertencente à família Poaceae, o milho (*Zea mays* L.) é cultivado em praticamente todas as regiões agrícolas do mundo e é o segundo grão mais cultivado no território brasileiro (CONAB 2020a). Este cereal apresenta importância tanto econômica como social. Econômica, devido ao valor nutricional dos grãos e por seu uso intenso nas alimentações humana e animal, além disso, é matéria-prima para a indústria. Social, porque por ser um alimento de baixo custo, apresenta viabilidade de cultivo tanto em grande quanto em pequena escala e, também, por ser a base de várias cadeias agroindustriais, como a de carne (GALVÃO et al., 2014).

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho, com cerca de 82,5 milhões de toneladas produzidas em uma área de aproximadamente 16,2 milhões de hectares, perdendo a liderança para os Estados Unidos (cerca de 392,5 milhões de t.) e China (cerca de 257, 4 milhões de t.). A quarta posição é ocupada pela Argentina, com um volume de produção de quase 43,5 milhões de t. (FAO, 2018).

Até os anos 1976/77, a produção de milho no Brasil consistia apenas em uma única safra: a safra de verão. Por volta de 1978/79, deu-se início, no estado do Paraná, ao plantio de milho de sequeiro cultivado extemporaneamente, ou seja, cultivado fora da época normal. Com semeadura principalmente após a colheita da soja precoce, esse cultivo passou a ser chamado de “milho safrinha” (DUARTE, 2015; CRUZ et al., 2010).

O sucesso do plantio de sequeiro, inicialmente no estado do Paraná, despertou interesse para o seu cultivo em outros estados e, no início dos anos 80, foi observado um grande incremento da produção de milho safrinha. Atualmente, o milho safrinha é produzido basicamente pelos estados do Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Um fato importante é que desde 2011 a produção de milho safrinha é maior que a de milho da safra normal, demonstrando a importância do novo tipo de cultivo desse cereal para o país (CRUZ et al., 2010; CONAB, 2020b).

Para cada uma das safras (safra de verão e safra de sequeiro ou inverno), cada região possui uma determinada época para o plantio. Assim, para a safra de verão, o plantio é feito no final de agosto na região Sul; em outubro nas regiões Sudeste e Centro-Oeste; e no início de cada ano na região Nordeste. Já a safra de inverno (safrinha), a semeadura é realizada de janeiro a abril, depois da soja precoce (CRUZ et al., 2010). Para o período 18/19, somadas a safra de verão e de inverno, o volume de produção desse cereal no país foi de cerca de 100 milhões de toneladas de grãos produzidos, em uma área de aproximadamente 17,5 milhões de hectares

(CONAB, 2019). A estimativa para a safra 2019/2020 é de 100,6 milhões de toneladas, com uma área total de aproximadamente 18,5 milhões de hectares plantados (CONAB, 2020a).

Por suas características fisiológicas, a cultura do milho tem alto potencial produtivo. No entanto, o nível médio nacional de produtividade ainda é considerado baixo, cerca de 6.047 kg ha⁻¹ na 1ª safra e 5.370 kg ha⁻¹ na 2ª safra (CONAB, 2020a). Em concursos de produtividade de milho conduzidos por empresas produtoras de semente e órgãos de assistência técnica e extensão rural, produtividade superior a 16 t.ha⁻¹ já foi obtida no Brasil. Isto demonstra que os diferentes sistemas de produção de milho deverão ser ainda bastante aprimorados para se obter aumento na produtividade e na rentabilidade que a cultura pode proporcionar (EMBRAPA, 2010).

Os fatores bióticos e abióticos podem interferir no estado fisiológico normal das plantas de milho podendo ocasionar situações de estresse e, em consequência, diminuir a produtividade da cultura. Os fatores abióticos, ligados ao clima, são aqueles que mais influenciam a redução da produtividade dessa cultura no país, entre eles a disponibilidade hídrica do solo, a temperatura do ar, a umidade relativa do ar e a irradiação solar. Por outro lado, os fatores bióticos também provocam perdas significativas por promoverem perturbações nos processos fisiológicos normais das plantas, sendo necessário o monitoramento constante da lavoura (SOUZA & BARBOSA, 2015). Dentre os fatores bióticos que podem levar as plantas de milho ao estresse devido às mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, interferindo em sua produtividade, pode-se citar a doença denominada enfezamento vermelho do milho.

Relatada inicialmente na década de 40 no estado norte-americano do Texas (ALTSTATT, 1945), essa doença teve o seu primeiro relato, no Brasil, na década de 70, no Estado de São Paulo (COSTA et al., 1971). Naquela época, foi considerada uma doença de importância secundária no país, no entanto, com alerta para os sérios prejuízos que poderia causar caso o milho fosse plantado tardiamente. A partir de meados da década de 80, com a introdução da prática conhecida como safrinha em grandes áreas, o enfezamento vermelho do milho passou a ocorrer com grande intensidade. Nesta época de plantio, as condições de ambiente favorecem o aumento da população do inseto vetor desse patógeno, resultando em maiores níveis de incidência da doença (OLIVEIRA et al., 2002; MASSOLA JUNIOR et al., 1999). A partir da explosão desta doença como problema sério, os plantios de milho no período do verão (plantios convencionais) também passaram a ser afetados.

O enfezamento pode provocar redução na produção de grãos, como demonstrado por dados de pesquisa e observações de campo. Em estudos sob condições de casa de vegetação, reduções de 52 a 72% foram causadas pela doença (TOFFANELLI, 2001); em ensaios de

campo, a doença reduziu em 70% a produção de plantas doentes quando comparadas com plantas saudáveis de mesma variedade (MASSOLA JÚNIOR, 1998); em campos comerciais, reduções de até 100% foram observadas, sendo a doença considerada como um fator limitante da produção (OLIVEIRA & SABATO, 2018; OLIVEIRA et al., 1998). É importante ressaltar que a permanência de plantas durante o ano todo no campo em áreas de plantios de milho irrigadas por pivô central, contribuiu para a ocorrência da doença em altas proporções, pois, essas plantas fornecem permanentemente inóculo para novos plantios e, ao mesmo tempo, são hospedeiras para a sobrevivência e multiplicação da cigarrinha vetora (BEDENDO, 2018).

O agente causal do enfezamento vermelho é um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrI-B, com base na análise das sequências de bases nucleotídicas do gene 16S rRNA (BEDENDO et al., 1997). Fitoplasmas são organismos procariotos unicelulares, sem parede celular, que apresentam uma única membrana ao redor do citoplasma (DAVIS, 1995). São parasitas obrigatórios de plantas e insetos, habitando o floema das plantas e a hemolinfa dos insetos, principalmente em cigarrinhas da Ordem Hemiptera (BERTACCINI, 2007).

Em condições naturais, o fitoplasma do enfezamento vermelho é transmitido para as plantas de milho por meio da cigarrinha *Dalbulus maidis* (DELONG & WOLCOTT), principal vetor do fitoplasma (NAULT, 1980). A característica desse inseto de se alimentar no floema está diretamente relacionada com a aquisição desse patógeno, o qual é estritamente habitante do floema (GRANADOS, 1969). A relação de *D. maidis* e o fitoplasma do enfezamento vermelho é do tipo persistente propagativa (NAULT et al., 1980). Além de transmitir esse fitoplasma, *D. maidis* é ainda vetor de outros dois patógenos associados também a doenças economicamente importantes para a cultura do milho na América Latina, ou seja, o *Spiroplasma kunkelii* e o vírus do raio fino (WAQUIL et al. 1999; OZBECK et al. 2003; AMMAR et al., 2011).

A importância de *D. maidis* para a cultura do milho deve-se principalmente a transmissão desses patógenos, os danos diretos dessa cigarrinha provocados pela sucção de seiva dos vasos do floema durante a sua alimentação nas plantas não são considerados de alta relevância (NAULT, 1980). Uma vez que o vetor inocula o patógeno nas plantas de milho, os sintomas exibidos são variáveis de acordo com o híbrido ou variedade de milho (BEDENDO, 1995). No entanto, na maioria das vezes, os sintomas se iniciam pelo amarelecimento das margens e do ápice das folhas, seguido pelo avermelhamento destas áreas e, às vezes, de toda a lâmina foliar. Proliferação de espigas anormais, brotações do tipo perfilhos nas axilas das folhas e na base da planta, redução do porte da planta, afinamento do colmo e encurtamento de entrenós também podem ser observados (NAULT, 1980, BEDENDO, 1995).

As recomendações de controle para o efezamento vermelho envolvem o tratamento de sementes com inseticidas específicos registrados no Ministério da Agricultura para o controle da cigarrinha; pulverizações com inseticidas nas plântulas de milho na fase inicial de plantio (primeiros 30-40 dias) e no final do ciclo da cultura; utilização de cultivares e híbridos de milho com resistência genética; eliminação de plantas voluntárias (tigueras) e evitar a semeadura tardia do milho (OLIVEIRA & SABATO, 2018).

O tratamento de sementes reduz a população do inseto vetor no período inicial de cultivo e, conseqüentemente, a intensidade da doença. No entanto, a cigarrinha ao se alimentar da planta pode transmitir o patógeno antes de morrer devido ao efeito do produto químico (OLIVEIRA & SABATO, 2018). Além disso, pode ocorrer a entrada contínua de cigarrinhas infectantes provenientes de lavouras adultas próximas, reduzindo a eficácia do tratamento das sementes com inseticidas. Logo, as pulverizações com inseticidas no início do plantio concedem proteção às plantas nesta fase de desenvolvimento. Já as pulverizações no final do ciclo da cultura podem reduzir a propagação do inóculo do fitoplasma, por causar redução na população de cigarrinhas migrantes para novas áreas (OLIVEIRA & SABATO, 2018). Há, atualmente, 19 produtos químicos registrados para *D. maidis* no MAPA, a maioria pertence aos grupos químicos dos neonicotinoides, piretroides, organofosforados e carbamatos.

Atualmente medidas de controle que não interferem negativamente no ambiente têm sido propostas como alternativas para serem usadas no manejo integrado de doenças associadas aos fitoplasmas (JARAUSCH & TORRES, 2014). A indução de resistência por meio de tratamentos com agentes bióticos e abióticos é uma alternativa que vem ganhando importância no manejo integrado de doenças (BRAND, 2016). O seu uso consiste no aumento da capacidade de defesa das plantas contra amplo espectro de organismos fitopatogênicos, incluindo fungos, bactérias e vírus, devido induzir a planta à produção de compostos antimicrobianos e/ou à elicitação de mecanismos de defesa. O tratamento das plantas com esses produtos pode promover uma diminuição no número de plantas infectadas, redução da gravidade dos sintomas e atraso do aparecimento da doença (ROMANAZZI, 2013).

O sucesso desses produtos tem sido observado em algumas espécies de plantas pertencentes à família Rosaceae e na videira, promovendo a recuperação de plantas infectadas por fitoplasmas (MUSETTI et al., 2013; ROMANAZZI, 2013). Os indutores mais comuns usados no controle de doenças associadas aos fitoplasmas são benzotiadiazol (BTH), fosetil-alumínio, prohexadiona de cálcio, ácido indol-3-butírico (IBA), ácido indol-3-acético (IAA), quitosana, ácido salicílico (SA), mistura de glutatona e oligossacarinas (GOs) (JARAUSCH &

TORRES, 2014). No Brasil, ainda não há registros da utilização de indutores de resistência para o manejo de fitoplasmas, seja em culturas perenes ou anuais.

Utilizado em conjunto com programas de controle químico, o acibenzolar-S-metílico, Bion[®] (Syngenta), é um exemplo de sucesso envolvendo indutores de resistência no meio comercial (DALLAGNOL et al., 2006). Além desse, outros compostos que possuem ação como indutores de resistência vêm sendo objeto de estudo, como a fitotoxina taxtomina A (GARCIA et al., 2008; BRAND 2016), produzida por *Streptomyces scabies*. As fitotoxinas atuam no desencadeamento dos mecanismos de defesas das plantas, além de possuírem capacidade para afetar processos metabólicos essenciais (PASCHOLATI & DALIO, 2018). Diante da possibilidade de produção *in vitro* da fitotoxina taxtomina A, diversos estudos começaram a explorar este metabólito como ativador de defesa em plantas (GARCIA et al., 2008; BRAND, 2016).

Apesar do potencial da taxtomina A e do acibenzolar-S-metílico em induzir resistência em plantas contra fitopatógenos, a eficácia de ambos ainda não foi testada para o controle de doenças associadas aos fitoplasmas. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do filtrado da suspensão de células (FSC) da bactéria *S. scabies*, que é a taxtomina A não purificada, e do acibenzolar-S-metílico (ASM) na indução da resposta de defesa do milho híbrido suscetível MG300 ao fitoplasma do enfezamento vermelho. Os objetivos específicos foram: a) avaliar os mecanismos bioquímicos alterados nas plantas de milho em resposta à aplicação dos potenciais indutores; b) verificar o efeito da aplicação dos potenciais indutores sobre o crescimento e produção de plantas de milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O milho (*Zea mays*) é uma das culturas mais importantes do mundo, seja do ponto de vista econômico, seja do ponto de vista social (SOLOGUREN, 2015). Na lista de países produtores, o Brasil ocupa o terceiro lugar, com cerca de 82,5 milhões de toneladas produzidas em uma área de aproximadamente 16,2 milhões de hectares (FAO, 2018). Esta posição alcançada ao longo dos anos foi principalmente decorrente de modificações no sistema de produção da cultura (SILVA et al., 2015). No entanto, essas mesmas mudanças têm sido responsáveis pelo aumento da incidência e da severidade das doenças (SILVA et al., 2015). Estima-se que o Brasil tenha uma perda anual de mais de um bilhão de dólares apenas na cultura do milho devido, exclusivamente, às pragas e doenças (WAQUIL, 2004).

A adoção do sistema de plantio direto, o aumento do uso de sistemas de irrigação, expansão da fronteira agrícola, ampliação das épocas de plantio (safra e safrinha), bem como, a ausência de rotação de cultura e o uso de materiais suscetíveis têm promovido modificações importantes na dinâmica populacional dos patógenos, resultando no surgimento, a cada safra, de novos problemas para a cultura, sobretudo relacionados à ocorrência de doenças (SILVA et al., 2015). Como consequência, têm ocorrido frequentemente perdas na produtividade, qualidade e valor nutritivo dos grãos e da forragem. Entre os problemas fitossanitários que afetam a cultura do milho, destaca-se a doença conhecida por enfezamento vermelho causada por um fitoplasma (NAULT et al., 1980; BEDENDO et al., 1997). Esta doença pode ser observada nas plantas de milho, ocorrendo de forma isolada ou em associação com a doença denominada enfezamento pálido causada por um espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*) e a risca ou raiado fino do milho, causada por um vírus (WAQUIL et al. 1999; OZBECK et al. 2003; AMMAR et al., 2011).

O enfezamento vermelho e o enfezamento pálido, juntos, têm causado danos expressivos nas lavouras de milho, particularmente nas regiões quentes do Brasil, onde a cultura é cultivada em mais de uma safra por ano. Ao serem comparadas plantas saudáveis com plantas doentes, têm sido observados altos índices de redução na produção de grãos. Em campos comerciais, perdas próximas de 100% têm sido registradas em diversas regiões brasileiras como no oeste da Bahia, sudoeste de Goiás, Triângulo Mineiro e noroeste de Minas Gerais, onde ocorreram recentes surtos epidêmicos (EMBRAPA, 2017).

O fitoplasma, agente causal do enfezamento vermelho, pertence ao grupo 16SrI-B, com base no sistema de classificação tradicional usado para fitoplasmas, o qual adota a diversidade genética das sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA (LEE et al., 1993; BEDENDO et al.,

1997). Esses agentes são organismos procariotos unicelulares, sem parede celular, que apresentam uma única membrana ao redor do citoplasma (DAVIS, 1995). São parasitas obrigatórios de plantas e insetos, e podem ser encontrados no floema das plantas e hemolinfa do inseto vetor (BERTACCINI, 2007).

O ciclo do enfezamento vermelho se inicia quando o vetor *Dalbulus maidis* (DELONG & WOLCOTT) (Hemiptera: Cicadellidae) adquire o fitoplasma ao se alimentar em plantas de milho infectadas e, posteriormente, passa a transmiti-los para as plantas saudáveis. O período entre a aquisição do patógeno e sua transmissão pela cigarrinha (período latente) é variável, sendo de três a quatro semanas. Em regiões onde o milho é cultivado em plantios sucessivos, a disseminação da doença ocorre pela migração da *D. maidis* de campos doentes para campos com plantas jovens. Em condições naturais, apenas espécies vegetais do gênero *Zea* são hospedeiras potenciais do fitoplasma do enfezamento vermelho (WAQUIL, 2004).

Esse patógeno interfere no desenvolvimento, na nutrição e na fisiologia das plantas infectadas e, em consequência, na produção de grãos. As plantas infectadas apresentam internódios mais curtos, menor volume de sistema radicular e produzem menor quantidade de grãos que as plantas saudáveis. A intensidade dos sintomas e a amplitude desses efeitos dependem do nível de resistência da cultivar e são, aparentemente, proporcionais à multiplicação do fitoplasma no tecido da planta. Plantas infectadas nos estádios iniciais de desenvolvimento apresentam esses efeitos de forma mais intensa (EMBRAPA, 2017).

Os sintomas exibidos pelas plantas doentes compreendem avermelhamento do ápice e das margens das folhas, podendo atingir toda a área foliar. Algumas cultivares mostram perfilhamento na base das plantas ou nas axilas foliares. Ainda, plantas infectadas podem apresentar pequenas espigas e grãos de tamanho reduzido. Os grãos, além de pequenos, podem apresentar-se manchados, frouxos na espiga ou chochos, devido ao seu enchimento incompleto (OLIVEIRA et al., 2003).

As medidas para o manejo da doença devem ser adotadas de forma integrada, pois nenhuma delas individualmente é suficiente (WAQUIL, 2004). Os métodos culturais são os primeiros a ser considerados, pois levando em consideração a bioecologia do patógeno e do vetor, esses métodos são os mais efetivos e econômicos; plantios tardios e os plantios escalonados em áreas próximas, por favorecerem a sobrevivência do inseto vetor e dos patógenos, devem ser evitados; como somente o milho sofre os danos causados pelo enfezamento, a rotação de culturas também é recomendada; além disso, áreas com histórico de alta incidência da doença devem ser deixadas em pousio por um período de pelo menos três meses; a erradicação de planta de milho “tiguera” (voluntário) deve também ser uma prática

sempre adotada, tanto em áreas de pousio como em áreas de rotação; monitoramento e a remoção de plantas com sintomas de enfezamento devem ser adotadas em áreas de erradicação da doença. Essas medidas quando adotadas, visam reduzir a população do vetor e a frequência de plantas doentes no campo, que possam servir como fonte de inóculo (WAQUIL, 2004). Além das práticas descritas, recomenda-se a utilização da resistência de plantas no manejo do enfezamento, bem como, o controle químico do inseto vetor através da utilização de inseticidas registrados para a *D. maidis* no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Em relação ao uso de cultivares/híbridos resistentes, a medida pode ser adotada tanto em relação ao patógeno como ao vetor. As aplicações de inseticidas podem ser feitas tanto na semente (tratamento industrial de sementes), quanto nas plantas (WAQUIL, 2004). A prática de manejo do enfezamento vermelho através do controle químico apresenta um fator limitante, o curto efeito residual dos inseticidas. Embora a cigarrinha seja sensível ao princípio ativo, o milho na fase vegetativa emite folhas novas constantemente e, reinfestações ocorrem; portanto, são necessárias pulverizações frequentes (WAQUIL, 2004).

Mesmo com a adoção das medidas de manejo para o enfezamento vermelho, sua incidência no campo tem aumentado, e isto se deve principalmente a mais de um ciclo da cultura a cada ano, permitindo a perpetuação da doença (OLIVEIRA et al., 2003). Com os crescentes problemas envolvendo a ocorrência da doença, torna-se imprescindível buscar alternativas que possam contribuir para a minimização desses problemas na cultura. Um método alternativo no controle de pragas e doenças que vem sendo testado em milho é a indução de resistência das plantas, estimulada por meio da aplicação de vários agentes indutores, de natureza biótica ou abiótica.

Na natureza, as plantas apresentam estratégias de defesa que permitem o retardamento ou até mesmo impedem a penetração de agentes fitopatogênicos. Além disso, as plantas reagem sob estresse abiótico, como por exemplo, variações de temperatura, ausência de água ou tratamento com agentes químicos. Esta defesa, a qual já está presente nas plantas, é composta de resposta constitutiva. Por outro lado, a forma de defesa que ocorre após o ataque de fitopatógenos ou o início do estresse abiótico, é a resposta induzida. Ambas envolvem mecanismos estruturais e bioquímicos. O reconhecimento pela planta do agente agressor ativa os mecanismos de defesa por meio de sucessivos eventos e sinais, alterações essas no metabolismo da planta que culminam com a ativação das barreiras físicas e químicas envolvidas no processo. Dentre as defesas utilizadas pelas plantas estão a resposta hipersensitiva (HR), indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas) e compostos sinalizadores,

como por exemplo, ácido salicílico, peróxido de hidrogênio, ácido jasmônico e etileno (FERNANDES et al., 2009).

A resistência sistêmica induzida, também conhecida pela abreviação SAR, do inglês (systemic acquired resistance), promove a redução dos sintomas da doença e, por ter efeito inespecífico, apresenta amplo espectro de ação sobre diferentes espécies de patógenos (KESSMANN et al., 1994a, b; MARTINEZ et al., 2000). Esta resistência ocorre em função da ativação das respostas bioquímicas nas plantas que estão inativas e podem ser ativadas pelo tratamento com agentes indutores, sejam eles de natureza abiótica (compostos químicos) ou de natureza biótica (início de uma tentativa de infecção por fitopatógenos, por exemplo).

A indução da SAR pode ser mediada pela via hormonal do ácido salicílico ou pela via hormonal do ácido jasmônico e etileno. Ambas são resistências induzidas, no entanto, alguns autores usam o termo SAR no caso da primeira via e o termo ISR (induced systemtic resistance) no segundo. A ativação dessas vias depende do agente indutor e a relação entre a via induzida com a natureza do agente indutor ainda é objeto de estudos (CAMARGO, 2018). A grosso modo, a via hormonal do ácido salicílico é induzida por agentes biotróficos, ao passo que a via hormonal do ácido jasmônico e etileno é induzida por agentes necrotróficos ou que causam danos celulares intensos, como é o caso dos danos causados por insetos mastigadores (CAMARGO, 2018).

É importante ressaltar que a indução de resistência apresenta caráter sistêmico, persistente e natural, podendo, até ser transmitida por enxertia. No entanto, a desvantagem em seu uso é que se trata de uma resistência parcial, incompleta e que pode requerer reativações sucessivas (PASCHOLATI et al., 2015). Mas mesmo assim, a SAR desperta muito interesse no que diz respeito ao controle de doenças. Vários trabalhos são encontrados na literatura testando o uso de diferentes indutores de resistência na ativação de mecanismos de defesa das plantas contra pragas e doenças do milho.

Neste contexto, PERDOMO (2017) avaliou a resistência induzida pelo silício (Si) em plantas de milho híbrido DEKALB 390RR2 contra *Spodoptera frugiperda* (Smith) e a influência deste elemento na produtividade de grãos da cultura através da aplicação de silicato de cálcio e de magnésio no solo, um mês antes da semeadura do milho híbrido. O autor verificou que o aumento no teor foliar de silício induziu resistência em plantas de milho a *S. frugiperda*, no entanto, não afetou a produtividade de grãos.

Na mesma linha, BORIN et al. (2019) verificaram o potencial do uso de fertilizantes a base de fosfitos (fosfitos de potássio e de cobre) associados ou não com fungicidas (carbendazim + thiram e metalaxyl-m) no tratamento de sementes de milho visando à ativação

de mecanismos de defesa vegetal, considerando parâmetros fisiológicos relacionados à germinação e ao vigor das sementes. Os resultados obtidos demonstraram que o efeito dos fungicidas aliados a fosfitos de potássio e de cobre, e os complexos nutricionais, mantiveram o potencial fisiológico das sementes de milho. No entanto, nenhum dos produtos interferiu no nível de proteínas totais, nem na ativação da rota dos fenilpropanoides e na síntese das enzimas quitinase e β -1,3 glucanase das plântulas, as quais estão envolvidas no sistema de defesa das plantas.

Avaliando o efeito do indutor de resistência acibenzolar-s-metílico (ASM), associado ou não, com os fungicidas, tebuconazol, trifloxistrobina + prothioconazol, piraclostrobina + epoxiconazol, no controle de doenças foliares em milho, NEUMANN et al. (2019) constataram que o ASM conseguiu frear o desenvolvimento do complexo da mancha branca e *Exserohilum turcicum*, mas não resultou em maior produtividade. No entanto, os fungicidas em mistura, conseguiram aumentar a produtividade em relação à testemunha. Neste trabalho, os autores realizaram duas aplicações de ASM, uma no estágio de crescimento V7 e a outra no estágio V10, enquanto os fungicidas foram aplicados no estágio de crescimento VT do milho.

Em outro estudo, foi verificado o efeito da indução de resistência no controle de *Colletotrichum graminicola* em plantas de milho em condições de casa de vegetação, por meio da utilização de diferentes produtos de origem abiótica e biótica. Para isto, foram testados os fertilizantes foliares High Roots[®], V6[®], Maxi Flor[®], Max Fruit[®], Foskalium[®] 30-20, fosfito de manganês, o extrato de *Ascochyllum nodosum* (Acadian[®]), os derivados biológicos de *Bacillus subtilis* (Serenade[®]), *Bacillus thuringiensis* (Dipel WP[®]) e o acibenzolar-s-metilílico (ASM). Todos os produtos foram pulverizados nas plantas de milho no estágio V4. Após 72 horas da pulverização dos tratamentos foi pulverizada a suspensão de conídios de *C. graminicola*. As avaliações foram realizadas através da severidade e do número de lesões cm⁻² nas folhas. Dentre os tratamentos testados, o único que controlou a doença foi o ASM (JACQUES, 2015).

Por outro lado, BARROS (2011), estudando a aplicação foliar de acibenzolar-s-metílico (ASM) em plantas de milho, não verificou benefícios da utilização do ASM tanto isoladamente quanto em mistura com fungicidas para o controle da cercosporiose e da ferrugem asiática em soja. Neste caso, o controle ocorreu apenas quando da utilização de fungicida químico, independentemente da adição do ASM.

Vários outros trabalhos podem ser encontrados na literatura utilizando diferentes agentes bióticos e abióticos na indução de respostas de defesa das plantas de milho contra pragas e doenças (KUMAR et al., 2009; ALMEIDA et al., 2015; FONTOURA et al., 2015), alguns deles com sucesso no controle e outros não. Isto se deve ao fato de que, dependendo da

rota metabólica ativada e da natureza do agente indutor (biótico ou abiótico), a indução de resistência pode exibir menor ou maior sucesso na proteção da planta (PASCHOLATI, 2015). Diante deste comportamento, é necessário o desenvolvimento de experimentos que elucidem tanto os mecanismos de defesa quanto a melhor forma de ativá-los na planta de milho, por meio da utilização de diferentes indutores disponíveis ou que ainda estão em estudo, mas apresentam potencial efeito indutor.

Em plantas infectadas por fitoplasmas, a remissão espontânea dos sintomas e a recuperação da planta têm sido observadas em alguns casos. A observação deste comportamento fez com que vários experimentos em diferentes espécies vegetais fossem desenvolvidos, os quais têm mostrado que a recuperação pode ser induzida artificialmente por estresse abiótico, tratamento com indutores de resistência ou moléculas antimicrobianas e aplicação de micorriza e rizobactéria (ROMANAZZI et al., 2013, 2009; ZAMHARIR, 2019; JARAUSCH & TORRES, 2014). Além disso, diversos trabalhos recentes indicam a importância de bactérias e fungos endofíticos no fenômeno de recuperação (JARAUSCH & TORRES, 2014; ROMANAZZI et al., 2009; GAMARELO et al., 2010).

Alguns exemplos de diferentes abordagens para o controle de doenças causadas por fitoplasmas por meio da indução de resistência são descritos. ROMANAZZI et al. (2009) avaliaram a eficácia de cinco produtos comerciais descritos como indutores de resistência, ou seja, Chito Plant (quitosana), Aliette (Fosetil-Al), Kendal (Glutaciona + oligossacarinas), Bion[®] (acibenzolar-S-metílico) e Olivis (Glutaciona + oligossacarinas), para promover a recuperação de videiras infectadas com “Bois noir (BN)” na Itália. Os tratamentos consistiram em pulverizações semanais na primavera-verão 2007 (sete aplicações) e 2008 (treze aplicações). Neste trabalho, foi verificado que a aplicação dos indutores provocou um aumento no número de plantas recuperadas em relação ao controle. Os melhores resultados foram obtidos com Kendal, Olivis e Bion[®], enquanto Aliette e Chito Plant tiveram melhor desempenho no primeiro ano. Não houve detecção de fitoplasmas nos extratos de nervuras das folhas das plantas recuperadas, verificado por meio de análise molecular. Os pesquisadores concluíram que, provavelmente uma indução da defesa do hospedeiro foi responsável pelo controle da doença.

ZAMHARIR & TAHERI (2019) testaram o uso dos indutores de resistência propamocarbe + fosetil e hymexazol pulverizados no dossel de videiras sintomáticas, infectadas por fitoplasmas nas províncias de Qazvin e Lorestan (Irã). As pulverizações foram realizadas na primavera de 2016 e 2017 (duas aplicações mensais). A análise de PCR de amostras de DNA extraídas de plantas recuperadas não detectou a presença de fitoplasma. Os resultados deste

estudo mostraram que esses indutores de resistência podem promover a defesa do hospedeiro contra a infecção por fitoplasmas.

O uso de bactérias benéficas às plantas para o controle de fitoplasmas também foi explorado. GAMARELO et al. (2010) avaliaram o efeito de *Pseudomonas putida* (S1Pf1Rif) contra a infecção do fitoplasma do crisântemo amarelo (CYP) em plantas de margarida. A biomassa vegetal, arquitetura radicular, severidade dos sintomas, título do fitoplasma e viabilidade foram avaliadas em plantas inoculadas em contraste com o controle. Como resultado observou-se que o CYP reduziu o crescimento da planta e o desenvolvimento da raiz. Além disso, embora o título do fitoplasma nas folhas apicais jovens não tenha sido afetado pela inoculação de S1Pf1Rif, a inoculação de *P. putida* melhorou o crescimento das plantas infectadas com CYP. Enquanto o título de CYP aumentou com o tempo em plantas não inoculadas, sua viabilidade diminuiu independentemente da presença de *P. putida* S1Pf1Rif. Por fim, foi verificado que as células do fitoplasma em folhas totalmente desenvolvidas e inoculadas com S1Pf1Rif frequentemente pareciam alteradas. Esses resultados indicaram que *P. putida* S1Pf1Rif é capaz de minimizar a doença, embora não afete a presença de fitoplasmas viáveis em folhas jovens e em desenvolvimento de plantas infectadas.

Cinco eliciadores (quitosana, duas formulações de glutatona mais oligossacarina, benzotiadiazol, fosetil-Al) foram aplicados semanalmente ao dossel de videiras infectadas com “Bois noir (BN)”. Os tratamentos que mais provocou a recuperação de plantas doentes foram o benzotiadiazol e as duas formulações de glutatona mais oligossacarina. Parâmetros qualitativos e quantitativos de produção iguais aos das plantas saudáveis foram observados em plantas recuperadas naturalmente, ou que se recuperaram por meio das aplicações dos indutores. Os pesquisadores citam ainda que não ocorreram efeitos negativos sobre o comprimento e produção de rebentos sobre as videiras pulverizadas com a formulação de glutatona mais oligossacarina. Por outro lado, plantas doentes apresentaram redução no comprimento e na produção de rebentos em relação as plantas saudáveis. Os autores chegaram à conclusão de que a aplicação de indutores de resistência promoveu a recuperação de videiras infectadas com BN, sem provocar efeitos adversos nas plantas (ROMANAZZI et al., 2013b).

Estudos realizados durante os últimos anos permitiram explicar as bases fisiológicas do fenômeno de recuperação de sintomas em plantas infectadas por fitoplasmas. Análises citoquímicas revelaram que este fenômeno é acompanhado por alterações bioquímicas nos vasos do floema. As plantas recuperadas acumulam, nos elementos do floema, uma espécie reativa estável de oxigênio, H_2O_2 , cujas funções sinalizadora e antimicrobiana são bem conhecidas. Essa variação do estado oxidativo dos elementos do floema leva a modificações

nos padrões de expressão e na conformação da proteína do vaso (proteína P), responsável pela oclusão do floema (JARAUSCH & TORRES, 2014). Neste trabalho os autores verificaram que nos vasos do floema de macieiras recuperadas, foi observado um acúmulo anormal de calose e proteína, associado à regulação positiva dos genes sintetizadores de calose e de codificação da proteína P. Essa resposta de defesa foi associada ao fato de que plantas recuperadas são capazes de desenvolver mecanismos de resistência dependentes do sinal e atividade de Ca^{2+} (JARAUSCH & TORRES, 2014; MUSETTI et al., 2013). Além disso, a ativação de mecanismos de defesa relacionado ao jasmonato (JA), via regulação positiva do gene JA foi verificado em plantas de maçã recuperadas da proliferação dos ramos induzida por fitoplasmas (MUSETTI et al., 2013).

JARAUSCH & TORRES (2014) descrevem ainda que os indutores de resistência, cujas moléculas são chamadas de elicitores (podendo ser de natureza abiótica ou biótica), ao desafiar a planta, leva-a a uma reação muitas vezes ligadas à produção de compostos antimicrobianos e/ou à elicitação de mecanismos de defesa da planta.

Os compostos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa das espécies vegetais e que possuem efeito antimicrobiano compreendem, compostos fenólicos, alcaloides, fototoxinas, espécies ativas de oxigênio, fitoalexinas, proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP), dentre outros (PASCHOLATI & DALIO 2018b). Esses compostos bioquímicos podem ser produzidos pelas plantas quando da tentativa de estabelecimento do patógeno ou por meio de estresses abióticos (PASCHOLATI & DALIO 2018b).

As espécies ativas de oxigênio são moléculas reduzidas, transitórias e altamente reativas, produzidas no caminho metabólico de transformação do oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O). Podem se acumular rapidamente no início do processo infeccioso em interações compatíveis ou incompatíveis. Na resistência a patógenos, podem contribuir atuando diretamente sobre o patógeno e, conseqüentemente, diminuindo o seu desenvolvimento nos tecidos; reforçando a parede celular em vista do favorecimento da formação de ligações cruzadas com proteínas estruturais; fortalecendo a integridade da membrana plasmática, devido a redução da sua fluidez, em função da peroxidação de lipídeos, dentre outras (PASCHOLATI & DALIO 2018b).

As proteínas-RP apresentam estabilidade em pH baixo (2,8) e altas temperaturas (60-70 °C), além de resistirem a ação de enzimas proteolíticas (PASCHOLATI & DALIO, 2018b). Podem ser produzidas pelas plantas durante o desenvolvimento normal, em resposta a estímulos abióticos ou como parte de um sistema induzível de defesa contra patógenos, contra os quais exercem algum tipo de controle. Dentre as proteínas-RP estão a β -1,3 glucanase e quitinase

(PASCHOLATI & DALIO, 2018b). Essas enzimas atuam através de seu efeito inibitório sobre o patógeno (PASCHOLATI & DALIO (2018b).

As peroxidases, as quais estão presentes nos tecidos das plantas (HOAGLAND, 1990), são glicoproteínas capazes de catalisar um grande número de reações. Entre elas estão a redução de H_2O_2 a H_2O , a formação de lignina, regulação hormonal, oxidação de fenóis, diferenciação celular e respostas gerais a estresses (SIEGEL, 1993). As diversas reações catalisadas pelas peroxidases ocorrem em diferentes locais das células, dependendo da reação que catalisam. O aumento da atividade das peroxidases pode ocorrer devido a infecção por patógenos, estresse ou eliciadores abióticos e bióticos.

Os compostos fenólicos são tóxicos aos patógenos. Alguns exemplos desses compostos são os ácidos clorogênico, caféico e ferrúlico. São produzidos rapidamente pela planta e se acumulam após a infecção, especialmente em variedades resistentes. Os fenóis possuem, pelo menos, um anel benzênico, com um ou mais grupos hidroxila, livres ou substituídos. Algumas de suas formas podem ser convertidas em derivados com radicais de oxigênio, extremamente reativos, tornando-se muito tóxicos (HARTLEB et al., 1997).

A clorofila faz parte do processo de absorção de energia luminosa para posterior transformação dessa energia em ATP (trifosfato de adenosina) que será utilizado na produção de fotoassimilados (MALKINNIYOGI, 2000). Alterações nos níveis de clorofila total, promovendo alterações na taxa fotossintética das plantas também são descritas em função de infecção por fitoplasmas. Alguns trabalhos atribuem o decréscimo na taxa fotossintética à redução na disponibilidade de CO_2 , devido ao constante fechamento estomatal, à diminuição da capacidade fotossintética ocasionada pela perda de clorofila ou à inibição da fotossíntese provocada pelo acúmulo de carboidratos nas folhas (GUTHRIE, 2001).

Em relação aos agentes indutores, o acibenzolar-S-metílico (ASM) é o composto sintético mais bem estudado como eliciador químico. A sua aplicação nas plantas provoca a ativação de genes da resistência sistêmica adquirida e das proteínas relacionadas a patogênese mediadas pelo ácido salicílico. Este composto atua de forma similar ao ácido salicílico na sinalização endógena da resistência sistêmica adquirida. JARAUSCH & TORRES (2014) descreveram os elicitores mais comuns usados no controle de doenças provocadas por fitoplasmas, atuando na recuperação das plantas doentes. Estes elicitores compreendem o benzotiadiazol (BTH), o fosetil-AL, o prohexadiona de cálcio, o ácido indol-3-butírico (AIB), o ácido indol-3-acético (AIA), a quitosana, o ácido salicílico (AS) e a mistura de glutatona e oligossacarinas (GOs).

A fitotoxina taxtomina A vem sendo estudada em diversos patossistemas, por possuir ação como indutor de resistência (GARCIA et al. 2008; BRAND, 2016). Isoladas e caracterizadas primeiramente em 1992 (KING et al. 1992), essa fitotoxina pertence a um grupo de fitotoxinas produzidas por microrganismos patogênicos do gênero *Streptomyces*, como, por exemplo, *S. scabies*. A produção desta fitotoxina *in vitro* já foi demonstrada em distintos meios de cultivo (BABCOCK et al. 1993; LORIA, 1995; GOYER et al. 1998). Por serem necessárias baixas concentrações de $\mu\text{g mL}^{-1}$ para que atue como eliciador na expressão dos mecanismos de defesa das plantas tratadas (GARCIA, 2008b), a fitotoxina taxtomina A tem sido utilizada como ativador de defesa em plantas. Esta fitotoxina, além de atuar no desencadeamento de mecanismos de defesas das plantas, apresenta a capacidade de afetar processos metabólicos essenciais (PASCHOLATI & DALIO 2018).

Apesar de vários estudos com acibenzolar-S-metílico na indução de resistência de plantas de milho contra diversas doenças e de várias pesquisas com a taxtomina A como promotora de indução de resistência em algumas espécies vegetais, nenhum destes compostos foram ainda testados quanto a sua eficácia no manejo do enfezamento vermelho do milho. Assim, o presente trabalho tem como um dos objetivos avaliar alterações bioquímicas relacionadas à defesa em plantas de milho, em resposta à aplicação do acibenzolar-S-metílico e do filtrado da suspensão de células de *S. scabies* (fitotoxina taxtomina A não purificada). Além disto, verificar o efeito desses agentes sobre alguns componentes de produção em plantas de milho portadoras do patógeno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental foi conduzida em dois ensaios: Experimento 1: efeito do filtrado da suspensão de células de *Streptomyces scabies* (FSC) e do acibenzolar-S-metílico (ASM) na indução de resistência em plantas de milho ao fitoplasma do enfezamento. Experimento 2: efeito destes dois produtos sobre alguns componentes de produção de plantas portadoras de fitoplasma.

3.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DO FILTRADO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS DE *Streptomyces scabies* E DO ACIBENZOLAR-S-METÍLICO NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM MILHO AO FITOPLASMA DO ENFEZAMENTO

O efeito de ambos os produtos foi avaliado pela determinação da atividade da enzima peroxidase, do conteúdo de clorofila total, das proteínas totais, dos açúcares redutores e dos fenóis totais, que envolve fenóis livres e ligados. As avaliações foram realizadas em cinco períodos após a pulverização desses compostos, ou seja, aos 0, 20, 40, 80 e 100 dias. Além disso, foi verificado, por meio de marcadores moleculares, se a aplicação do ASM e do FSC promoveria algum atraso na detecção do patógeno em plantas inoculadas, quando comparadas com plantas não inoculadas. Para isto, o ensaio de detecção também foi avaliado nesses cinco períodos.

3.1.1. Local do ensaio e delineamento experimental

O ensaio foi instalado em casa de vegetação localizada no Departamento de Fitopatologia e Nematologia – LFN da Esalq/USP, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), no dia 28 de abril de 2019, com última coleta de amostras para as análises bioquímicas no final de julho de 2019.

Para avaliar o efeito dos indutores, o ensaio foi realizado usando os seguintes tratamentos: Tratamento 1 (T1) = pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) + não confinamento da cigarrinha; Tratamento 2 (T2) = pulverização do filtrado da suspensão de células (FSC) + confinamento da cigarrinha infectiva; Tratamento 3 (T3) = pulverização do acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion[®] 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha; Tratamento 4 (T4) = pulverização do ASM + confinamento da

cigarrinha infectiva. Os controles foram: controle positivo (C^+) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva; controle negativo (C^-) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha; controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva; controle do meio de cultivo da bactéria *Streptomyces scabies* (CMA) = pulverização do meio aveia líquido sem *Streptomyces scabies* + não confinamento da cigarrinha.

O número de repetições avaliado para cada tratamento e controle foram quatro. Cada repetição consistiu em uma planta crescida em saco plástico.

3.1.2. Obtenção das plantas de milho

Para o ensaio, três sementes de milho foram semeadas em sacos de plástico preto para mudas (35 cm x 45 cm x 0,25 cm), contendo uma mistura de solo previamente esterilizada, matéria orgânica e areia. Após a germinação, somente uma plântula foi mantida em cada saco. Aos 25 dias após a emergência as plantas foram adubadas com 3,6 g de sulfato de amônio, acrescido de 7,2 g da fórmula 4-14-8 (1:2) em cada saco. Esta adubação foi repetida a cada 25 dias até a fase de enchimento dos grãos.

3.1.3. Obtenção do filtrado da suspensão de células (FSC) de *Streptomyces scabies*

O inóculo de *S. scabies* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, localizado no Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Esalq/USP. Este inóculo foi obtido da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF), em Campinas, SP.

Inicialmente, preparou-se o meio líquido de aveia composto por mistura de 40 g de farinha de aveia comercial e 1000 mL de água destilada, realizada em liquidificador. Agitou-se esta mistura por dois minutos para a sua homogeneização. Posteriormente, foi transferido um volume de 100 mL da mistura para frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade de volume de 250 mL e, procedeu-se à autoclavagem por 20 minutos, a 121 °C e 1 atm. Em câmara de fluxo contínuo, adicionou-se 250 µL da suspensão de *S. scabies* (inóculo) em cada Erlenmeyer contendo o volume de 100 mL. Após a transferência da suspensão, estes frascos foram mantidos na incubadora a 28 °C, rotação de 225 rpm, por cinco dias, no escuro. Na sequência, o conteúdo foi coado em gaze para remover a parte sólida mais grossa do cultivo e depois foi filtrado em

membrana do tipo Millipore™ (0,22 µm), com o auxílio de uma seringa. O líquido resultante foi utilizado como o tratamento filtrado da suspensão de células (FSC). O meio líquido de aveia foi utilizado como o tratamento controle do meio de cultivo da bactéria (CMA). Tanto o filtrado derivado do meio colonizado como aquele livre da bactéria foram armazenados em tubos do tipo Falcon de 50 mL. Estes tubos foram revestidos de papel alumínio e mantidos no freezer (-20 °C) até o momento da pulverização nas plantas de milho.

3.1.4. Acibenzolar-S-metílico

Para o tratamento com o acibenzolar-S-metílico (ASM) utilizou-se o produto comercial da Syngenta, Bion® 50 WG. Não há registro do produto para a cultura do milho. Por este motivo utilizou-se a concentração recomendada para a cultura do trigo que é de 25 g ha⁻¹, considerando um volume de calda de 150 L ha⁻¹. Portanto, a concentração de trabalho foi de 0,166 g L⁻¹.

3.1.5. Aplicação do filtrado da suspensão de células (FSC) e do acibenzolar-S-metílico (ASM)

Aos oito dias após o plantio foi realizada a aplicação dos indutores por meio de pulverização com o auxílio de um pulverizador de gotas pequenas para facilitar a aderência do produto, até o ponto de escorrimento. Nesta data, as plantas apresentavam três folhas completamente expandidas. O filtrado foi utilizado na concentração original. Desta forma, retirou-se os tubos Falcon do congelador (-20 °C) e quando o filtrado atingiu a temperatura ambiente, foi aplicado nas plantas. A calda do ASM foi preparada diluindo-se o produto comercial em água. A concentração de trabalho foi de 0,166 g L⁻¹. As plantas que não receberam o tratamento com ASM ou o FSC, foram pulverizadas com água.

3.1.6. Obtenção das populações infectivas e não infectiva do vetor *Dalbulus maidis*

Ambas as populações foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP. A população sadia foi obtida a partir da coleta de insetos adultos em culturas de milho. Estes insetos foram colocados para ovoposição em plantas saudias, com 4-6 folhas, durante um período de cinco dias. Antes da eclosão, os ovos foram removidos e depositados sobre novas plantas saudias. As ninfas nascidas

destes ovos estavam livres de fitoplasma, pois este agente não é transmitido via transovariana. A população foi mantida em plantas acondicionadas em gaiolas teladas.

Para a obtenção da população infectiva, ninfas de segundo e terceiro ínstaes, foram criadas em plantas sadias e, posteriormente, transferidas para planta fonte de fitoplasma. Na planta fonte, as ninfas foram mantidas no cartucho durante quatro dias por meio de um saco de tecido do tipo voal. Após a fase de aquisição, as ninfas foram transferidas para plantas sadias mantidas no interior de gaiolas de criação, onde permaneceram por um período de 25 dias, correspondentes ao período de latência.

Para facilitar o confinamento de cigarrinhas infectivas e não infectivas em cada planta de milho, coletou-se, com o auxílio de um sugador conectado a uma bomba à vácuo, oito cigarrinhas por vez, das gaiolas de criação e transferiu-se para tubos de ensaio, onde, foram soltas em cada tratamento/repetição.

3.1.7. Inoculação experimental das plantas com o fitoplasma

A inoculação foi realizada em plantas com 10 dias após o plantio, usando-se gaiolas de acetato transparente com dimensões de 29,7 cm de altura e 10,5 cm de diâmetro, onde foram confinadas as cigarrinhas juntamente com as plantas de milho. Um total de oito cigarrinhas foram confinadas por planta durante um período de cinco dias, quando as gaiolas foram retiradas e os insetos eliminados das plantas.

3.1.8. Isolamento de DNA genômico de plantas de milho

Amostras de folhas (1-2g) foram coletadas de todos os tratamentos nos períodos de 0, 20, 40, 80 e 100 dias após a aplicação do ASM e do FSC. A extração do DNA total foi realizada seguindo-se o protocolo CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987). Para isto, o material vegetal foi transferido para um almofariz e macerado na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, o material vegetal foi transferido para um tubo *eppendorf* de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 800 µl de tampão de extração [CTAB 2% (p/v); β-mercaptoetanol 0,2% (v/v)] pré-aquecido a 65°C. A mistura foi agitada em agitador do tipo vortex para homogeneização dos componentes. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 60 minutos.

Durante esse período os tubos foram agitados a cada 15 minutos para homogeneizar a suspensão. Na sequência, 600 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram adicionados à mistura, a qual foi homogeneizada até a obtenção de uma emulsão leitosa. As amostras foram, então, centrifugadas a 15000 rpm durante 10 minutos a 24°C, para separar a fase orgânica da aquosa. Uma alíquota de 540 µl fase aquosa foi removida para um tubo novo de 1,5 mL, evitando-se perturbar a interface. Em seguida, adicionou-se 540 µl de isopropanol gelado (-20°C), invertendo-se vagarosamente o tubo durante 1 minuto até formar um precipitado. O material foi incubado a -20°C durante uma noite. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 15000 rpm por 10 minutos, a 24°C. Após, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado por duas vezes com 1 mL de etanol 80% gelado (v/v) (-20°C). Os tubos foram colocados invertidos sobre papel absorvente por cerca de 20 minutos para evaporação do etanol. Um volume de 500 µl de NaCl 1M foi adicionado e o precipitado ressuscitado. Nova incubação foi realizada por 30-60 minutos a 4 °C. Em seguida, nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 15000 rpm. O sobrenadante foi removido para um novo tubo e o precipitado descartado. Um volume de 350 µl de isopropanol gelado (-20°C) foi adicionado e a mistura foi incubada por uma noite (-20°C). Após centrifugação a 15000 rpm durante 10 minutos a 24°C, o precipitado foi lavado duas vezes com 1 ml de etanol 80% gelado por 10 minutos e os tubos foram invertidos novamente sobre papel absorvente por cerca de 20 minutos. O precipitado foi ressuscitado em 100 µl de água milliQ autoclavada e armazenado a -20°C. A quantificação e verificação da qualidade do DNA foram feitas em espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific).

3.1.9. Detecção do fitoplasma por duplo PCR

As reações de PCR foram processadas em um aparelho termociclador (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT). O par de iniciadores (*primers*) R16mF2/mR1 seguido de R16F2n/R2 (GUNDERSEN & LEE, 1996) foram empregados para a amplificação do fragmento genômico correspondente ao 16S rDNA. Como padrão positivo foi utilizado o DNA extraído de plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) e milho, que foram positivas para a presença de fitoplasmas em ensaios realizados anteriormente. Enquanto os padrões negativos foram representados pelo DNA de plantas saudáveis de milho e pela água.

O volume final das reações de PCR foi de 25 µL, contendo 24 µL de mistura de reação e 1 µL do extrato do DNA diluído (1:50). Os constituintes da mistura de reação e os seus respectivos volumes foram: 18,14 µL de água deionizada autoclavada (milliQ), 2,5 µL de

solução tampão 10x PCR (Go Taq® Green Master Mix, Promega, USA), 2 µL de dNTP (concentração de 200 µM para cada base), 0,6 µL de cada iniciador (concentração de 20 pmol/µL) e 0,16 µL de Amplitaq 5 U/ µL. O produto da primeira reação foi utilizado como molde na reação de re-amplificação com os iniciadores R16F2n/R2, após a sua diluição em água na proporção de 1:50. As condições de PCR compreenderam 35 ciclos, onde cada ciclo foi composto pelas seguintes etapas: 1 minuto a 94°C para desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos a 55 °C para hibridização dos iniciadores e 3 minutos a 72 °C para extensão da fita. Nas duas reações utilizando os pares de iniciadores R16mF2/mR1 e R16F2n/R2, foi permitida uma etapa inicial de desnaturação de 1 minuto a 94 °C e uma etapa final de extensão de 7 minutos a 72 °C (GUNDERSEN E LEE, 1996). Os produtos obtidos na reação de duplo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo o corante Sybr safe® 1% (Promega), usando-se tampão 1 X TAE e marcador molecular 1kb DNA ladder (Life Technologies). A corrida eletroforética foi processada com uma corrente elétrica de 65 volts durante um período de 60 minutos, sendo os fragmentos genômicos visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

3.1.10. Identificação do fitoplasma por PCR com primers específicos para o grupo 16SrI

Os produtos amplificados na primeira reação de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 foram reamplificados com iniciadores específicos para fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI, utilizando-se o par R16(I) F1 (LEE et al., 1994). O padrão positivo foi representado pelo DNA extraído de planta de milho sabidamente infectada por fitoplasma e como controles negativos foram usados a água e o DNA obtido de plantas de milho sadias.

O programa estabelecido para as condições de PCR foi de 35 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as seguintes etapas: desnaturação por 1 minuto (2 minutos no primeiro ciclo) a 94° C, anelamento por 2 minutos a 50° C e extensão por 3 minutos a 72 °C (7 minutos no último ciclo) (LEE et al., 1993). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e tampão 1X TAE (48,5 ml de Tris base, 7,45 g de EDTA, 900mL de água destilada, pH 8,0). A voltagem utilizada na corrida eletroforética foi 65 V por 60 minutos. A visualização das bandas, correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados, foi feita em um aparelho transluminador de luz ultravioleta. Para coloração do gel, utilizou-se o corante Sybr safe® 1% (Promega). O marcador de peso molecular utilizado no gel de agarose foi 1kb DNA ladder (Life Technologies).

3.1.11. Análises bioquímicas

3.1.11.1. Obtenção e armazenamento das amostras de tecido foliar

Para a realização das análises bioquímicas, amostras de tecido foliar (0,5 g – 1,0 g) foram coletadas de folhas completamente expandidas, localizadas no terço médio das plantas de milho. Para fins de padronização, as coletas foram realizadas na região central das folhas. Imediatamente após a coleta, as amostras foram colocadas em envelopes de filme de alumínio previamente confeccionados e mergulhadas em nitrogênio líquido até o momento do armazenamento. Posteriormente, as amostras foram retiradas do nitrogênio líquido e armazenadas em -20 °C até o momento das análises. O conteúdo de clorofila nas folhas de milho foi determinado no mesmo dia de cada coleta, não havendo assim a imersão das amostras em nitrogênio líquido e posterior armazenamento. Para isto, as amostras de tecido foliar foram armazenadas em sacos plásticos e identificadas. Em seguida, foi realizada a pesagem e a leitura do conteúdo de clorofila.

3.1.11.2. Determinação do conteúdo de clorofila total

Amostras de tecido fresco (0,5 – 1g) foram colocadas em almofarizes gelados, os quais foram mantidos a -20 °C um dia antes das análises, e maceradas na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, ao pó fino, adicionou-se 10 mL de acetona 80% (utilizada sempre gelada, 4 °C). A suspensão foi homogeneizada e, posteriormente, transferida para tubos de centrifuga de 15 mL. As amostras foram sempre mantidas no gelo e no escuro após a maceração. Em seguida, o material foi centrifugado a 3.000g durante 5 minutos, a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e mantido no escuro. Em seguida, a absorbância dos sobrenadantes foram registradas usando-se um espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1900, nos comprimentos de ondas de 645 nm, 663 nm e 710 nm, sendo o conteúdo de clorofila total de cada amostra expresso em mg de clorofila/g de tecido fresco (MACKINNEY, 1941). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando-se do programa estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011).

3.1.11.3. Quantificação de proteínas totais e atividade de guaiacol peroxidase

3.1.11.3.1. Obtenção do extrato protéico

Para a obtenção do extrato protéico, as amostras de tecido vegetal de cada um dos tratamentos e controles, previamente identificadas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram transferidas para almofarizes resfriados ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Na sequência, adicionou-se nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona (PVP) 0,5% (peso/volume). O tecido macerado foi rapidamente transferido para tubos de centrifuga onde, adicionou-se 4 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5) resfriado ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). A solução foi homogeneizada invertendo-se sutilmente os tubos. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g durante 25 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante obtido, considerado como o extrato protéico, foi distribuído em tubos Eppendorf de 1,5 mL e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior determinação de proteínas totais (*item 3.1.11.3.2*) e da atividade de guaiacol peroxidase (*item 3.1.11.3.3*).

3.1.11.3.2. Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais foram quantificadas usando-se o método de BRADFORD (1976). Para isto, em tubos de ensaio foram adicionados 5 μL do extrato protéico (*item 3.1.11.3.1*) e 795 μL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5). Em seguida, a esta solução, foi adicionado 200 μL do reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) concentrado em cada um dos tubos de ensaio. Após 5 minutos, fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1900, a 595 nm. Uma curva padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA) ($0\text{--}12\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) foi realizada diluindo-se 0,05 g de BSA em 50 mL de água ($1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) e este diluído 40 vezes em água novamente (0,1 mL da solução em 3,9 mL de água), obtendo-se uma concentração de trabalho de $25\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados foram utilizados para a expressão da atividade específica de guaiacol peroxidase. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando-se do programa estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011).

3.1.11.3.3. Atividade de guaiacol peroxidase

A atividade da enzima guaiacol peroxidase foi determinada em espectrofotômetro a 470 nm, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol (LUSSO & PASCHOLATI, 1999).

Para isto, a solução de leitura foi composta por 100 μL do extrato protéico diluído (*item* 3.1.11.3.1) e 2,9 mL de solução de reação (250 μL de guaiacol comercial e 306 μL de peróxido de hidrogênio para cada 100 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M [pH 6,5]). Como a atividade da enzima guaiacol peroxidase era muito elevada quando se trabalhava com a concentração inicial do extrato protéico, dilui-se este extrato duas vezes em tampão de extração (50 μL do extrato em 100 μL do tampão) e as leituras foram realizadas com o extrato diluído como descrito anteriormente. Na cubeta de referência (branco) utilizou-se 2,9 mL da solução de reação e 100 μL do tampão de extração fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5). A solução de reação foi mantida a 30 °C em banho maria. A leitura em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1900, foi realizada pelo período de 1 minuto. A atividade de guaiacol peroxidase foi expressa em $\Delta\text{OD}_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando-se do programa estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011).

3.1.11.4. Quantificação de açúcares redutores

Para a determinação do conteúdo de açúcares redutores, amostras de tecido foliar (0,5g-1g), mantidas a - 20 °C, foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e PVP até a obtenção de um pó fino, seguida da adição de 3 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). Estas suspensões foram transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas a 20.000 g por 25 minutos a 4 °C. Em seguida, 500 μL da suspensão obtida (extrato) foram transferidos para tubos de ensaio e adicionado 1,5 mL de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (1g dissolvido em 20 mL de HCl a 0,5 M com adição de 80 mL de NaOH a 0,5 M). A solução foi incubada a 100 °C por 5 minutos. Após o resfriamento, foi determinada a absorbância da amostra a 410 nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1900. Os resultados foram expressos em mg de glicose/g tecido fresco, tendo a glicose como carboidrato padrão (LEVER, 1972). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando-se do programa estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011).

3.1.11.5. Quantificação de fenóis livres e ligados

Amostras de tecido foliar (0,5 g – 1g) armazenadas a -20 °C, foram maceradas em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. O macerado foi transferido para tubos de

ensaio e adicionados 4 mL de metanol 50%. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1,5 horas a 80 °C. As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e centrifugadas a 20.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para a determinação do conteúdo de fenóis livres pela reação de Folin-Ciocalteu. Para esta reação, adicionou-se 3 mL de Na₂CO₃ (2%) em 150 µL do extrato obtido anteriormente (sobrenadante) e aguardou-se 5 minutos. Em seguida foi adicionado 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água 1:1 (v:v) e aguardou-se mais 20 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1900, a 750 nm. Na cubeta de referência (branco), utilizou-se a mistura de 150 µL de metanol 50%, 3 mL de Na₂CO₃ (2%) e 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água 1:1 (v:v).

Para determinação dos fenóis ligados (KOFALVI & NASSUTH 1995), utilizou-se o precipitado resultante da centrifugação para a obtenção do extrato de fenóis livres. A este extrato foram adicionados 2 mL de NaOH 0,5 M para saponificação dos fenóis ligados à parede. Após 24 horas, a reação foi neutralizada com a adição de 9,5 mL de HCL 2M, seguida por centrifugação a 20.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado e armazenado para a determinação de fenóis ligados através da reação de Folin-Ciocalteu, descrita anteriormente. A cubeta de referência (branco) foi composta por 150 µL coletados da mistura de 2 mL de NaOH 0,5 M e 9,5 mL de HCl 2M, 3 mL de Na₂CO₃ (2%) e 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água 1:1 (v:v).

A concentração de fenóis foi expressa em equivalentes de mg de ácido clorogênico por g de tecido fresco⁻¹ (BRAY & THORPE 1954). Para tanto, uma curva padrão de ácido clorogênico (0 – 250 µg) foi confeccionada e os valores obtidos com base na equação da curva. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando-se do programa estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011).

3.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO DO FILTRADO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS (FSC) DA BACTÉRIA *S. scabies* E DO PRODUTO COMERCIAL ACIBENZOLAR-S-METÍLICO (ASM) NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE PLANTAS DE MILHO INFECTADAS COM O FITOPLASMA DO ENFEZAMENTO VERMELHO, EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

As plantas foram inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho 48h após a pulverização dos indutores sobre as folhas. As avaliações foram feitas mediante a determinação da massa seca das folhas (g), massa seca do caule (g) e massa seca da raiz (g). Além disto, foi

avaliado o efeito desses produtos sobre as variáveis: número de folhas/planta, altura de plantas (cm), diâmetro do caule (cm), número de espigas/planta, tamanho da espiga (cm), diâmetro da espiga (cm), massa seca da espiga (g), massa seca dos grãos (g) e massa seca do sabugo (g).

O ensaio foi constituído dos seguintes tratamentos: Tratamento 1 (T1) = pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha; Tratamento 2 (T2) = pulverização do filtrado da suspensão de células (FSC) + confinamento da cigarrinha infectiva; Tratamento 3 (T3) = pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) + não confinamento da cigarrinha; Tratamento 4 (T4) = pulverização do acibenzolar-S-metil (ASM) + confinamento da cigarrinha infectiva. Os controles foram: controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva; controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha; controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva; controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio aveia líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha.

Neste experimento, em vez de quatro repetições como foram feitas para o experimento I descrito anteriormente, foram utilizadas seis repetições por tratamento. Foi mantida uma planta por saco plástico e cada repetição foi representada por uma única planta.

Para este ensaio, utilizaram-se os mesmos materiais e métodos empregados no experimento I, assim como o local do ensaio, obtenção do filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies*, preparo da calda do acibenzolar-S-metílico (ASM), além da forma de aplicação desses agentes, obtenção das populações infectivas e não infectivas do vetor *D. maidis*, inoculação do fitoplasma pelo vetor, extração do DNA genômico de plantas doentes, detecção do fitoplasma nas plantas e identificação do fitoplasma por PCR com primers específicos para o grupo 16SrI. A metodologia empregada para a determinação das variáveis de crescimento e produção estão apresentadas abaixo.

3.2.1. Avaliação das variáveis de crescimento e produtividade do milho

As avaliações da altura de plantas (cm), diâmetro do colmo (cm), número de folhas/planta, número de espigas/planta, tamanho da espiga (cm) e diâmetro da espiga (cm) foram obtidas no estágio R3 do desenvolvimento fisiológico das plantas. Já as variáveis massa seca da parte aérea (folhas e colmo) (g), massa seca da raiz (g), massa seca da espiga (g) e massa seca dos grãos (g) foram determinadas entre os estádios R5 e R6, na qual boa parte da umidade dos grãos já havia sido perdida. Utilizou-se fita métrica para as determinações de altura

e diâmetro das variáveis. Para a determinação das massas das variáveis analisadas, seis plantas foram coletadas por tratamento, dissecadas, separando-se folhas + bainhas, colmos, raiz e espigas em embalagens distintas. Cada fração da planta foi colocada em embalagens de papel kraft. Com exceção da espiga, as frações da planta foram secas em estufa a 55°C até a obtenção de massa constante (+/- 3 dias). Após este período, as amostras tiveram as determinações de suas respectivas massas. Para a determinação da massa da espiga e dos grãos, as espigas foram descascadas e submetidas à secagem natural. Após secas, obteve-se a massa seca da espiga e a massa seca dos grãos debulhando-as.

Para a determinação da altura de plantas (cm), diâmetro do colmo (cm) e número de folhas/planta, as amostragens foram realizadas em quatro plantas, pois algumas repetições dos tratamentos foram perdidas ao longo do experimento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Scott-Knott ($p \leq 0,005$), utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DO FILTRADO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS (FSC) DE *Streptomyces Scabies* E DO ACIBENZOLAR-S-METÍLICO NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.) AO ENFEZAMENTO VERMELHO

4.1.1. Sintomatologia das plantas de milho

Os primeiros sintomas foram observados nas plantas entre 20 a 40 dias após a inoculação, sendo caracterizados por leve clorose nas margens das folhas, evoluindo para o avermelhamento da lâmina foliar.

Ao longo do ciclo da cultura, foi possível verificar que as plantas de milho dos tratamentos FSC de *S. scabies* + inseto infectivo e Bion + inseto infectivo, bem como, o controle C₊ (H₂O + inseto infectivo) apresentaram sintomas de clorose e avermelhamento das folhas, lâmina foliar aparentemente mais fina, quando comparada com uma planta sadia, folhas novas torcidas, redução do tamanho da planta, encurtamento dos entrenós e afinamento do colmo. Além disto, foi observada a presença de espigas com tamanho reduzido, poucos grãos e distribuição dos grãos de forma desordenada na espiga (Figura 1). Não foram observados sintomas nas plantas dos tratamentos FSC de *S. scabies* + H₂O e Bion + H₂O, bem como, nos controles C₋ (H₂O + H₂O), CIV (H₂O + inseto não infectivo) e CMA (meio aveia líquido + H₂O).

Os sintomas observados nas plantas de milho estão de acordo com os sintomas relatados na literatura para o enfezamento vermelho (NAULT, 1980). No entanto, é importante ressaltar que, os sintomas exibidos em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma são variáveis de acordo com a variedade ou híbrido (BEDENDO, 1995; NAULT, 1980).

Figura 1: Plantas de milho híbrido suscetível MG300 assintomáticas e sintomáticas. A – Lâmina foliar assintomática observada nos tratamentos onde não houve o confinamento do inseto vetor infectivo *D. maidis*. B-F - Lâminas foliares apresentando sintomas de clorose e avermelhamento exibidos por plantas que receberam o confinamento do vetor infectivo *D. maidis*. G e H - Plantas de milho confinadas com o vetor infectivo *D. maidis* com tamanho reduzido, encurtamento dos entrenós, afinamento do colmo e folha mais nova torcida (H). I e J - Espigas improdutivas, com tamanho reduzido, grãos distribuídos de forma irregular presentes em plantas infectadas com o fitoplasma.

4.1.2. Detecção e identificação do fitoplasma

A detecção e identificação do fitoplasma foram realizadas por meio de duplo PCR em amostras coletadas aos 0, 20, 40, 80 e 100 dias após a aplicação do ASM (Bion) e do FSC de *S. scabies*. A associação dos sintomas com a presença do fitoplasma nas plantas foi confirmada pela amplificação de fragmentos genômicos, visualizados na forma de bandas de aproximadamente 1,2 kb, em gel de agarose. Extratos de plantas assintomáticas não apresentaram bandas, revelando ausência do fitoplasma (dados não apresentados).

Os ensaios de PCR com *primers* específicos para fitoplasmas do grupo 16SrI, para as amostras que testaram positivo para a presença do fitoplasma com os *primers* universais, confirmaram a identidade do fitoplasma como pertencente a este grupo, o que está em consonância com as informações descritas na literatura, a qual reporta o fitoplasma do enfezamento como afiliado ao subgrupo 16SrI-B (BEDENDO et al., 1997).

A primeira detecção da presença do patógeno nos tecidos das plantas ocorreu aos 20 dias após a pulverização dos indutores. No entanto, foi observada em apenas uma única repetição do tratamento Bion + inseto infectivo. As demais plantas apresentaram-se negativas no teste para a presença do fitoplasma (Tabela 1). Por outro lado, aos 40, 80 e 100 dias após a pulverização dos produtos, todas as plantas inoculadas com o patógeno testaram positivas para a presença do fitoplasma, exceto uma única repetição do tratamento Bion + inseto infectivo aos 40 dias após a pulverização.

A presença do fitoplasma ao longo do ciclo das plantas demonstrou que o ASM (Bion) ou o FSC não promoveram atraso no aparecimento do patógeno nos tecidos das plantas, uma vez que, comportamento semelhante foi observado para o controle positivo C₊ (H₂O + inseto infectivo) (Tabela 1). A ativação de mecanismos de defesa das plantas por parte de agentes indutores, sejam eles de natureza biótica ou abiótica, pode inibir ou retardar a multiplicação do patógeno nos tecidos das plantas. No entanto, os resultados revelaram que o patógeno permaneceu ativo, tanto nas plantas que receberam o tratamento com o ASM, quanto naquelas que foram pulverizadas com o FSC, uma vez que sua detecção foi persistente até a última avaliação feita aos 100 dias após as pulverizações.

As primeiras detecções do patógeno, ocorridas entre os 20 – 40 dias após a pulverização, estão em concordância com os trabalhos da literatura. Assim, JUNQUEIRA (2003) verificando as alterações bioquímicas em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma, em casa de vegetação, observou que somente a partir dos 40 dias após a inoculação as plantas passaram a exibir os sintomas iniciais da doença e o fitoplasma passou a ser detectado pela técnica de PCR. Comportamento semelhante foi observado por HAAS (2010), estudando potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma e o espiroplasma. Neste trabalho, detectou-se a presença do fitoplasma do enfezamento vermelho a partir dos 20 – 40 dias após a inoculação do fitoplasma.

Tabela 1: Número de plantas infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho, 0, 20, 40, 80 e 100 dias após a pulverização do ASM (Bion) e do FSC de *S. scabies* e identificação do patógeno pela técnica de PCR utilizando *primer* específicos para fitoplasmas de grupo 16Sr I

N°	Tratamento	Detecção ^a					Identificação 16Sr I-B ^b				
		N° de plantas infectadas/N° de plantas inoculadas (100% de infecção)					N° de plantas positivas para o grupo 16Sr I-B/ N° de plantas infectadas				
		0 dias	20 dias	40 dias	80 dias	100 dias	0 dias	20 dias	40 dias	80 dias	100 dias
T1	FSC de <i>S. scabies</i> + H ₂ O	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
T2	FSC de <i>S. scabies</i> + inseto infectivo	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	0/0	0/0	4/4	4/4	4/4
T3	Bion + H ₂ O	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
T4	Bion + inseto infectivo	0/4 (0,0)	1/4 (25)	3/4 (75)	4/4 (100)	4/4 (100)	0/0	1/1	3/3	4/4	4/4
C ⁺	H ₂ O + inseto infectivo	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	3/4 (75)	4/4 (100)	4/4 (100)	0/0	0/0	3/3	4/4	4/4
C ⁻	H ₂ O + H ₂ O	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
CIV	H ₂ O + inseto não infectivo	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
CMA	Meio aveia + H ₂ O	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

^a Pares de *primers* R16mF2/R16mR1 – R16F2n/R16R2 utilizados na detecção do fitoplasmas nas amostras de milho híbrido suscetível MG300.

^b Pares de *primers* utilizados na identificação do fitoplasma grupo 16Sr I.

4.1.3. Alterações bioquímicas em plantas de milho híbrido suscetível MG300 pulverizadas com o ASM ou com o FSC de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho

4.1.3.1. Conteúdo de clorofila total

Os resultados da avaliação do conteúdo de clorofila total das plantas de milho podem ser visualizados na figura 2 e 3. A pulverização das plantas com o ASM ou com o FSC não possibilitou maior acúmulo no conteúdo de clorofila total nas plantas, ao longo de seu ciclo. MENDOZA et al. (2006) apontaram que os níveis de clorofila variam em relação ao genótipo do milho e ao teor de nitrogênio na planta, além de alterações devido a danos causados por doenças, insetos ou geadas.

Quando comparadas, as médias do conteúdo de clorofila total dos tratamentos Bion + inseto infectivo e FSC de *S. scabies* + inseto infectivo, verificou-se que somente aos 20 dias após a pulverização dos indutores ocorreram diferenças significativas. A diferença entre as médias observada neste período de avaliação poderia ser explicada pela presença do fitoplasma nos tecidos em uma das repetições do tratamento Bion + inseto infectivo, mas não nas plantas do tratamento FSC + inseto infectivo, influenciando no menor conteúdo de clorofila do primeiro tratamento. No entanto, Bion + inseto infectivo não diferiu significativamente dos tratamentos FSC + H₂O, Bion + H₂O, H₂O + inseto não infectivo, H₂O + inseto não infectivo e meio líquido de aveia + H₂O neste período.

Entre os 20 - 40 dias após a pulverização houve uma redução significativa no conteúdo de clorofila total para todos os tratamentos e controles. Neste período, os maiores conteúdos de clorofila total foram apresentados pelo controle negativo C⁻ (H₂O + H₂O), Bion + H₂O, e meio aveia + H₂O. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos inoculados (Bion + inseto infectivo, H₂O + inseto infectivo) e não inoculados (FSC + H₂O, Bion + H₂O e H₂O + inseto não infectivo) aos 20 dias após a pulverização dos potenciais indutores. Comportamento semelhante também foi observado aos 40 dias após a aplicação dos indutores, plantas inoculadas (FSC + inseto infectivo, Bion + inseto infectivo e H₂O + inseto infectivo) não foram distintas das plantas não inoculadas (FSC + H₂O, H₂O + inseto não infectivo), provavelmente porque os sintomas apresentados pelas plantas ainda eram muito leves

Por outro lado, aos 80 e 100 dias após a pulverização dos produtos, as menores médias foram verificadas para os tratamentos infectados pelo patógeno, independentemente se foram ou não pulverizados com o FSC ou com o ASM, não havendo diferenças significativas entre eles, porém, significativamente distintos dos demais.

Figura 2: Conteúdo de clorofila total em folhas de milho híbrido suscetível MG300 coletadas 0, 20, 40, 80 e 100 dias após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão.

As médias do conteúdo de clorofila total dos cinco períodos para todos os tratamentos e controles, encontram-se na figura 3. Os menores conteúdos de clorofila total observado neste estudo em ordem decrescente e significativamente distintos foram para os seguintes tratamentos e controles: H₂O + H₂O (1,50 mg de clorofila por grama de MF⁻¹), meio aveia + H₂O (1,42 mg de clorofila por grama de MF⁻¹), Bion + H₂O (1,40 mg de clorofila por grama de MF⁻¹), FSC + H₂O (1,32 mg de clorofila por grama de MF⁻¹) e H₂O + inseto não infectivo (1,28 mg de

clorofila por grama de MF⁻¹) > H₂O + inseto infectivo (0,93 mg de clorofila por grama de MF⁻¹) e FSC + inseto infectivo (0,92 mg de clorofila por grama de MF⁻¹) > Bion + inseto infectivo (0,71 mg de clorofila por grama de MF⁻¹).

Ao analisarem o potencial do filtrado de cultura de *Pycnopus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*, em ativar enzimas de defesa do feijoeiro, como peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3 glucanase, bem como alterar teores de proteína total e clorofilas, quando comparado com os controles água, acibenzolar-S-metílico (ASM) e fungicida (azoxystrobin), VIECELLI et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes aqueles resultantes deste estudo. Estes autores constataram que não houve diferenças significativas entre os controles água e ASM em relação ao conteúdo de clorofila total aos 7 dias após a aplicação dos produtos nas plantas. Por outro lado, verificaram que os maiores teores de clorofila nas plantas estavam presentes naquelas que receberam o tratamento filtrado de cultura de *P. sanguineus*. Já ZÚÑIGA-SILVESTRE et al. (2020), investigando a indução de resistência em híbrido de milho Ceres XR21 suscetível a *Puccinia sorghi*, através da aplicação de cinco produtos comerciais de origem biológica e química relatados como indutores de resistência, além de um fungicida, à saber, Actigard 50 GS® (Acibenzolar metil), Alliete® (Fosetyl aluminum), Soil (at sowing), Consist Max® (trifloxystrobin+tebuconazol), Messenger® (harpin protein Ea), Poncho Votivo® (*Bacillus firmus*+clothianidin) e Max® (*Bacillus subtilis*), demonstraram que os tratamentos não causaram variação significativa no teor de clorofila. Estes achados demonstram que o teor de clorofila na planta não é alterado significativamente pela utilização de indutores de resistência, mas sim por outros fatores como a presença do patógeno em seus tecidos.

Alguns estudos têm demonstrado uma correlação existente entre o decréscimo de clorofila com a presença do fitoplasma nos tecidos das plantas. OLIVEIRA et al. (2020) estudando o impacto da doença flavescência dourada (DF) no crescimento, produtividade e alterações ultraestruturais das plantas de *Vitis vinífera*, verificou que as plantas com a doença diminuíram significativamente (até 35%) os valores de SPAD, quando comparadas com plantas saudáveis, indicando um menor teor de clorofila nas folhas das plantas doentes. ENDESHAW et al. (2012) verificaram o mesmo comportamento em um estudo realizado com a cv. Chardonnay de *V. vinífera* em interação com a doença Bois noir (BN), mostrando que a presença de BN diminuiu o teor de clorofila nas folhas da videira em cerca de 22%, na época da colheita. Em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento, esse mesmo comportamento já havia sido observado (JUNQUEIRA et al., 2003; HAAS, 2010).

CHOI et al. (2004) explicam que a falta de clorofila nas folhas em plantas infectadas por fitoplasmas pode ser devido ao bloqueio da biossíntese da clorofila pela glicose ou ácido succínico. Este bloqueio é provocado pelas grandes mudanças que ocorrem na fisiologia do floema em plantas infectadas por fitoplasmas, afetando a translocação de fotoassimilados da planta hospedeira (MUSETTI et al., 2013b). SANTI et al. (2013) sugeriram que o acúmulo de amido nas folhas da videira com a doença Bois noir (BN), pode resultar em bloqueio dos vasos do floema.

As análises dos valores do conteúdo de clorofila total e do conteúdo de açúcares redutores das plantas de milho deste estudo evidenciaram que os resultados são concordantes com as informações descritas na literatura pois, em plantas infectadas pelo patógeno os valores do conteúdo de açúcares redutores foram significativamente mais altos, independentemente se as plantas foram ou não pulverizadas com o ASM ou com o FSC (Figura 4 e 5). Ou seja, as plantas que revelaram as menores médias do conteúdo de clorofila total foram aquelas que apresentaram os maiores conteúdos de açúcares redutores (Figura 2 e 5).

Figura 3: Conteúdo médio de clorofila total em folhas de milho híbrido suscetível MG300, avaliado em cinco períodos. As plantas foram inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho 48 horas após a pulverização com os indutores acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies*. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio aveia líquido sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio aveia + H₂O). Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si no teste Scott-Knott a $p \leq 0,05$. As barras nas colunas representam o erro padrão.

4.1.3.2. Conteúdo de açúcares redutores

Quanto ao conteúdo de açúcares redutores, observou-se um aumento neste componente durante o período de duração do ensaio. O teor de açúcares redutores foi significativamente maior em plantas infectadas pelo fitoplasma, independentemente se foram ou não pulverizadas com o ASM ou com o FSC.

Somente a partir dos 40 dias após a pulverização do ASM ou do FSC foram verificadas as primeiras diferenças significativas entre os tratamentos. O nível do conteúdo de açúcares redutores do tratamento Bion + inseto infectivo (1,19 mg glicose g tecido fresco) foi significativamente inferior ao do tratamento FSC + inseto infectivo (5,15 mg glicose g tecido fresco). No entanto, Bion + inseto infectivo não foi significativamente distinto dos controles.

Aos 80 e 100 dias após a pulverização dos indutores verificou-se que os valores do conteúdo de açúcares redutores foram significativamente mais elevados em plantas inoculadas com o patógeno, independentemente se foram ou não pulverizadas com os produtos. Aos 80 dias, os tratamentos Bion + inseto infectivo e FSC apresentaram o conteúdo de açúcares redutores duas vezes superior ao do controle positivo C+. Contudo, aos 100 dias, não houve diferenças significativas entre Bion + inseto infectivo (7,47 mg glicose g tecido fresco), FSC + inseto infectivo (8,02 mg glicose g tecido fresco) e H₂O + inseto infectivo (7,27 mg glicose g tecido fresco).

Considerando apenas plantas não inoculadas, não foi observado nenhum efeito da aplicação dos tratamentos ASM e do FSC, em relação aos controles, quanto ao conteúdo de açúcares redutores.

Figura 4: Conteúdo de açúcares redutores em folhas de milho híbrido suscetível MG300 coletadas 0, 20, 40, 80 e 100 dias após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho, 48 horas após a pulverização dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão.

Os valores médios do conteúdo de açúcares redutores obtidos nos cinco períodos de avaliação estão apresentados na figura 5. Os resultados mostraram que houve diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que os maiores níveis médios de açúcares redutores foram constatados em plantas que receberam a pulverização com FSC e foram inoculadas com o patógeno, seguido do Bion + inseto infectivo e, posteriormente pelo controle positivo C⁺. O comportamento dos controles seguiu tendências similares, ou seja, plantas pulverizadas com o ASM, FSC e meio aveia (sem inoculação do patógeno) apresentaram valores intermediários quanto ao conteúdo de açúcares redutores. Os menores valores foram observados no controle

negativo C⁻ (H₂O + H₂O) e CIV (H₂O + inseto não infectivo). Embora não tenham sido observadas diferenças entre a aplicação do ASM e do FSC, bem como, do meio de aveia (CMA), quando comparados com o controle negativo dentro dos períodos de avaliação (0, 20, 40, 80 e 100 dias após a aplicação dos indutores), os dados apresentados na figura 5 demonstraram que parece haver um efeito da aplicação dos tratamentos no conteúdo médio de açúcares nas plantas.

O acúmulo de carboidratos encontrado neste trabalho em folhas de plantas sintomáticas faz parte de uma série de alterações encontradas em células infectadas por fitoplasmas. OLIVEIRA et al., 2020, por exemplo, verificaram modificações estruturais nos tecidos do floema de folhas de videira sintomáticas, além do colapso de células e vacúolos (células do floema), espessamento da parede celular e acúmulo de calose nas placas do floema. Alterações fisiológicas, incluindo fechamento estomático, redução da taxa fotossintética e acúmulo de carboidratos nas folhas também já foram observadas (ENDESHAW et al., 2012; SANTI et al., 2013; VITALI et al., 2013) em diferentes espécies vegetais, incluindo a *Vicia faba* e *Solanum lycopersicum* (MUSETTI et al., 2013b; SANTI et al., 2013; AHMED et al., 2016). Essas alterações podem comprometer a translocação dos fotoassimilados, reduzir o tamanho e o vigor das plantas e, consequentemente, prejudicar o rendimento da cultura (OLIVEIRA et al., 2020).

O bloqueio dos vasos do floema, comprometendo a translocação dos fotoassimilados das folhas fonte para outras partes das plantas, é atribuído tanto à presença do patógeno nesses vasos como à produção de metabólitos tóxicos pelo hospedeiro na tentativa de se defender do patógeno (GUTHRIE et al., 2001). Segundo CHAOLING XUE et al. (2018), por serem restritos aos floemas e se multiplicarem nesses vasos, os fitoplasmas afetam o transporte de carboidratos sintetizados pelas folhas para outros órgãos drenos.

Nos tecidos de plantas sadias normalmente se observa a diminuição do conteúdo de amido nos cloroplastos durante o período de crescimento das plantas, indicando que o produto fotossintético das folhas fonte foi degradado e transportado para apoiar o crescimento de órgãos drenos, como flores e frutos. Em plantas infectadas por fitoplasmas, o produto fotossintético é acumulado nas folhas doentes, o que promove um acúmulo de amido e inibição da fotossíntese. Isto é confirmado pela maior expressão de genes relacionados à fotossíntese em plantas sadias do que nas folhas de plantas doentes (CHAOLING XUE et al., 2018). Estas informações vêm ao encontro dos resultados obtidos no presente trabalho, pois ao mesmo tempo em que as plantas inoculadas tiveram seus teores de açúcares redutores elevados, apresentaram também redução em seus teores de clorofila total (Figuras 4 e 2) e, possivelmente, redução nas taxas fotossintéticas.

Os resultados obtidos neste trabalho são concordantes com aqueles obtidos por JUNQUERIA (2003). O referido autor relatou que em plantas de milho inoculadas houve alterações nos processos metabólicos do hospedeiro, indicadas pelo aumento das concentrações de proteínas, açúcares redutores e fenóis.

Figura 5: Conteúdo médio de açúcares redutores avaliado em cinco períodos, em folhas de milho híbrido suscetível MG300, após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho, 48 horas após a pulverização dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio aveia + H₂O). Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si no teste Scott-Knott a $p \leq 0,05$. As barras nas colunas representam o erro padrão.

4.1.3.3. Conteúdo de fenóis livres e ligados

Com relação ao conteúdo de fenóis livres (Figura 6 e 7), não foram encontradas alterações significativas nas plantas, após a pulverização do ASM e do FSC aos 20, 40, 80 e 100 dias. No entanto, quando as plantas foram pulverizadas e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho, observou-se um aumento significativo no conteúdo de fenóis livres nos tratamentos Bion + inseto infectivo e FSC + inseto infectivo aos 40 dias após a pulverização do ASM e do FSC, para ambos os tratamentos e, aos 80 dias para o tratamento FSC + inseto infectivo, quando comparados com o controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo). Estes resultados mostraram que quando os primeiros sintomas começaram a aparecer nas plantas (20 -30 dias após a pulverização do ASM e do FSC) e, simultaneamente, ocorreram as primeiras detecções do patógeno nos tecidos (20 – 40 dias), as plantas pulverizadas com o ASM e com o FSC apresentaram os maiores níveis de acúmulo de fenóis livres nas células. Entre si, estes tratamentos não foram significativamente distintos, mas diferiram significativamente de todos os controles. No entanto, à medida em que o patógeno foi se multiplicando nos tecidos (80 dias após a pulverização), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos Bion + inseto infectivo, FSC + inseto infectivo e o controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo). Aos 100 dias o comportamento deste componente nas plantas sofreu mudanças, os maiores conteúdos foram observados em plantas do tratamento FSC + inseto infectivo. Este tratamento diferiu significativamente do tratamento Bion + inseto infectivo. Entretanto, Bion + inseto infectivo não diferiu do controle aos 100 dias após a pulverização.

Em um experimento para entender os mecanismos de multiplicação e migração de fitoplasma no interior da planta hospedeira, WEI et al. (2004), usando o patossistema crisântemo/fitoplasma do amarelo da cebola, observaram que após o fitoplasma ser inoculado em uma parte da planta pelo seu vetor *Macrostelea striifrons*, a sua distribuição para as demais partes da planta ocorreu a partir da folha inoculada para o caule principal (1 dia após a inoculação – dpi); em seguida o patógeno atingiu as raízes e a folha superior (2 dpi); e as demais folhas de cima para baixo (de 7 a 21 dpi). Estes autores observaram ainda que a população do fitoplasma nas folhas e raízes inoculadas aumentou em, aproximadamente, seis vezes a cada semana de 14 a 28 dpi. Aos 14 dpi, o patógeno colonizou regiões limitadas do tecido do floema na raiz e no caule e, então, se espalhou por todo o floema (21 a 28 dpi).

Tomando como base o modelo descrito, é sugerido que a distribuição do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho entre os 20 – 40 dias após a pulverização dos tratamentos, momento em que o patógeno foi detectado pela primeira vez nas plantas, já estava presente em

boa parte dos tecidos. Provavelmente, com o aumento da população entre os períodos de avaliação, no final do experimento, as plantas foram negativamente afetadas pelo patógeno. Com base nestas informações, é possível inferir que inicialmente houve uma tentativa de resposta da planta em se defender do ataque do patógeno até aos 40 dias após a aplicação do ASM e do FSC, uma vez que os maiores conteúdos de fenóis livres foram observados nas plantas neste período. Estes tratamentos diferiram significativamente de todos os outros controles. No entanto, essa resposta não perdurou, pois aos 80 dias após a aplicação dos tratamentos, o conteúdo de fenóis livres nas plantas pulverizadas com o ASM e com o FSC não foi significativamente maior do que o controle positivo (C^+). No entanto, ressalta-se que, foi observado maiores valores no conteúdo de fenóis livres nesses dois tratamentos em relação aos tratamentos controles. Esse aumento foi observado também aos 100 dias, porém o valor foi significativo somente para o tratamento FSC. Assim, pode-se inferir que ocorre a produção de fenóis livres em resposta à pulverização da planta com ASM e FSC, no entanto, não permanece constante e não foi suficiente para evitar os danos provocados pelo fitoplasma nas plantas, provavelmente pelo aumento da população do fitoplasma nos vasos do floema. Estudos conduzidos futuramente para verificar qual o melhor número de aplicações/forma de aplicação dos indutores e a duração dos efeitos sobre as plantas, bem como, os efeitos sobre o patógeno poderiam elucidar melhor o papel dos indutores de resistência na interação milho e fitoplasma do enfezamento vermelho.

Figura 6: Conteúdo de fenóis livres em folhas de milho híbrido suscetível MG300 coletadas aos 0, 20, 40, 80 e 100 dias após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento do milho, 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão.

A aplicação do ASM ou do FSC em plantas de milho, nas condições deste experimento, não interferiu significativamente no conteúdo de fenóis livres das plantas (Figura 7). Além disso, observou-se que as maiores médias desses compostos foram obtidas em plantas que foram inoculadas com o fitoplasma. Esses valores foram significativamente maiores àqueles obtidos com as plantas não inoculadas. Vale ressaltar que o tratamento FSC + inseto infectivo foi significativamente distinto dos demais tratamentos e controles (Figuras 6 e 7), demonstrando que, neste caso, as plantas apresentaram melhor resposta quanto ao conteúdo de fenóis.

Segundo LABANCA (2002), os compostos fenólicos são produzidos em células especializadas distribuídas pelos tecidos, ao acaso ou em locais estratégicos, na forma original ou glicolisada e são compartimentalizados em vesículas. Sob condições de estresse, esses compostos se tornam tóxicos (não reduzidos) e são descompartimentalizados (HRAZDINA, 1994). O acúmulo desses compostos em tecidos vegetais depende do nível de resistência do hospedeiro, do patossistema e, no caso de resistência induzida, do indutor (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992). Em plantas de sorgo e milho resistentes ao fungo *Peronosclerospora sorghi*, por exemplo, foram observadas não só diferenças quantitativas, mas também qualitativas nos compostos fenólicos formados (ANWAR et al., 1995). No presente estudo, os indutores ASM e FSC apresentaram distinção quanto à capacidade de induzir a planta a produzir maior ou menor quantidade de fenóis livres.

Figura 7: Conteúdo médio de fenóis livres em avaliações feitas em cinco períodos a partir de folhas de milho híbrido suscetível MG300, após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento do milho, 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si no teste Scott-Knott a $p \leq 0,05$. As barras nas colunas representam o erro padrão.

A aplicação do FSC promoveu um aumento de fenóis livres em quase duas vezes, em relação ao controle positivo C⁺ e ao tratamento Bion + inseto infectivo (Figura 6). No entanto, nenhum dos tratamentos contribuiu para minimizar os efeitos do patógeno sobre as plantas de milho, medidos na forma de crescimento e produção.

Em relação ao teor de fenóis ligados, observou-se que, assim como os fenóis livres, estes compostos tiveram suas concentrações aumentadas com a idade das plantas (Figura 8). No entanto, este aumento só foi significativo aos 80 e 100 dias após a pulverização do ASM e do FSC para os tratamentos Bion + inseto infectivo, FSC + inseto infectivo e controle positivo C⁺

(H₂O + inseto infectivo). Dentro de cada período, diferenças significativas foram encontradas somente aos 80 e 100 dias após a pulverização do ASM ou do FSC. Aos 80 dias, houve diferenças significativas entre as plantas inoculadas e não inoculadas, independentemente se foram ou não pulverizadas com o ASM ou com o FSC. Aos 100 dias, constatou-se maior acúmulo de fenóis ligados no tratamento Bion + inseto infectivo. Este foi significativamente distinto do tratamento FSC + inseto infectivo. O conteúdo de fenóis ligados do tratamento FSC + inseto infectivo não diferiu do controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo).

Figura 8: Conteúdo de fenóis ligados em folhas de milho híbrido suscetível MG300 coletadas 0, 20, 40, 80 e 100 dias após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho, 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão.

Os resultados expressos na figura 9 mostram que somente a aplicação do ASM ou do FSC não interferiu significativamente no conteúdo de fenóis ligados das plantas, pois os controles não apresentaram diferenças significativas com os tratamentos. As maiores médias desses compostos foram observadas em plantas que foram inoculadas com o fitoplasma, independentemente se foram ou não pulverizadas com o ASM ou com o FSC, ou seja, os tratamentos Bion + inseto infectivo, FSC + inseto infectivo e controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo) não foram significativamente distintos.

Derivados do metabolismo secundário das plantas, os compostos fenólicos são essenciais para o seu crescimento e reprodução, sendo formado sob condições de estresses produzido por infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK et al., 2004). Os compostos fenólicos são multifuncionais e existem cerca de cinco mil tipos de fenóis e, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. Os taninos e as ligninas são alguns compostos fenólicos que não se apresentam na forma livres nos tecidos vegetais (SHAHIDI et al, 1995).

A lignina é um polímero aromático presente na parede da célula vegetal que atua como uma barreira à entrada de fungos no tecido e à difusão de enzimas que possam facilitar a degradação da parede e facilitar o processo de infecção, promovida por esses microrganismos (VANCE et al. 1980; EGEE et al. 2001). O fortalecimento da estrutura da parede celular através da formação de diversos compostos ligados a ela e a síntese de fitoalexinas, compõem a resistência dita como inata ou basal das plantas e auxilia na prevenção da infecção de maior parte dos fungos (LYGIN et al. 2009).

Figura 9: Conteúdo médio de fenóis ligados em avaliações feitas em cinco períodos a partir de folhas de milho híbrido suscetível MG300, após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento do milho, 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si no teste Scott-Knott a $p \leq 0,05$. As barras nas colunas representam o erro padrão.

Em plantas de maçã e ameixa infectadas por fitoplasma, MUSETTI et al. (2000) verificaram um aumento significativo na quantidade de cutina, suberina e tanino, substâncias que estão envolvidas na lignificação das plantas, através da análise de polifenóis totais em tecidos infectados. Segundo esses autores, um aumento na lignificação das células poderia ser uma tentativa das plantas em restringir a multiplicação de fitoplasmas nos vasos do floema.

Em dois híbridos de milho (suscetível e resistente), inoculados com o fitoplasma do enfezamento vermelho, também foram verificados aumentos no conteúdo de fenóis (totais) ao longo do ciclo da cultura, observando-se maiores acúmulos no híbrido suscetível (JUNQUEIRA, 2003).

No presente estudo, observou-se um acúmulo significativo de fenóis livres aos 40 dias após a pulverização do FSC e ASM nos tratamentos Bion + inseto infectivo e FSC + inseto infectivo, quando comparado aos controles. Aos 100 dias, foi evidenciado também um aumento; no entanto, somente para o tratamento FSC + inseto infectivo, quando comparado com Bion + inseto infectivo e o controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo). No conteúdo de fenóis ligados, o tratamento FSC + inseto infectivo apresentou menor conteúdo em relação ao tratamento Bion + inseto infectivo; no entanto, este não foi distinto do controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo). Essa elevação na quantidade de fenóis apresenta relação com a formação de uma barreira física e química que atua no processo de invasão de fitopatógeno (BALLESTER et al., 2013). Segundo SUDHAMOY (2010), este acúmulo pode ser ocasionado pela aplicação de eliciadores que são capazes de afetar as plantas de maneira que estas desencadeiem respostas de defesa complexas. LIU et al. (2007), por exemplo, observaram que a aplicação de quitosanas em tomateiro resultou na elevação dos compostos fenólicos e proporcionou às plantas proteção contra *Passalora fulva*.

Neste estudo, o aumento no conteúdo de fenóis livres e ligados nas plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho não inibiu a ação do patógeno na planta, sendo observados os sintomas de forma expressiva nas plantas, como redução do porte da planta, enfezamento e baixa produção.

O sintoma de avermelhamento observado em plantas de milho com a doença enfezamento vermelho possivelmente se deve ao acúmulo de antocianinas nas folhas (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992). As antocianinas fazem parte dos compostos fenólicos encontrados nas plantas. Desta forma, é possível que o aumento de fenóis totais (livres e ligados) verificado neste estudo em plantas infectadas pelo fitoplasma, poderia estar também relacionado com o aumento destas substâncias, uma vez que as plantas infectadas apresentaram esse tipo de sintoma.

4.1.3.4. Conteúdo de proteínas totais

Os resultados da análise do conteúdo de proteínas totais para os diferentes tratamentos, ao longo do desenvolvimento das plantas de milho, estão apresentados na figura 10. As médias

dos cinco períodos avaliados estão apresentadas na figura 11. De um modo geral, houve aumento no conteúdo de proteínas totais em plantas inoculadas e não-inoculadas. No entanto, esse aumento foi significativo somente aos 80 e 100 dias para os seguintes tratamentos e controles: Bion + H₂O, Bion + inseto infectivo, Meio + H₂O e H₂O + inseto não infectivo, e aos 100 dias para FSC + inseto infectivo, FSC + H₂O, H₂O + inseto infectivo e H₂O + H₂O. Esses dados revelaram que existe uma diferença significativa entre os tratamentos Bion + inseto infectivo e FSC + inseto infectivo, sendo o tratamento Bion + inseto infectivo com os maiores valores. No entanto, Bion + inseto infectivo não foi significativamente distinto do Meio aveia + H₂O, H₂O + inseto não infectivo e Bion + H₂O. O efeito do meio de aveia sobre o conteúdo de proteínas totais em plantas de milho pode ser atribuído à existência de algum componente desconhecido no meio, o qual possui a capacidade de ativar uma resposta na planta, promovendo o aumento do conteúdo de proteínas totais. Comportamento semelhante a este foi observado *in vitro* quando se verificou o efeito de diferentes tratamentos, incluindo o ASM, meio de aveia, FSC etc (autoclavado e não autoclavado), sobre a germinação de urediniósporos de *Puccinia pachyrhizi*. Os resultados revelaram que esses tratamentos reduziram a baixas proporções a germinação desses esporos (10 – 20 %) (PAULA, 2019).

O aumento do conteúdo de proteínas totais no controle CIV (H₂O + inseto não infectivo), com valores superiores ao controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo), observados neste estudo, demonstrou que a presença do inseto vetor nos tecidos da planta, por si só, provocou uma resposta de defesa. De acordo com FERRY et al. (2004), as repostas das plantas ao ataque de insetos sugadores (Hemiptera) é típico do ataque de agentes fitopatogênicos, como exemplo das conhecidas interações gene a gene.

Dentro de cada período, verificou-se que a aplicação do ASM (sem a inoculação do patógeno) provocou uma resposta significativa na planta, quando comparado com o FSC e com o controle negativo C⁻ (H₂O + H₂O) aos 80 dias após a pulverização desses compostos, em relação ao conteúdo de proteínas totais. Porém, este efeito foi inferior àquele induzido pelo confinamento de cigarrinhas não infectivas (CIV). Aos 100 dias após a pulverização do ASM e do FSC, não houve diferenças entre nenhum desses tratamentos. Com relação à aplicação desses potenciais indutores e inoculação das plantas com o fitoplasma, aos 80 dias após a pulverização, verificou-se que o tratamento Bion + inseto infectivo apresentou maior conteúdo de proteínas totais. FSC + inseto infectivo não diferiu do controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo). Aos 100 dias, observou-se os maiores valores para os tratamentos Bion + inseto infectivo e FSC + inseto infectivo. Esses tratamentos foram significativamente mais altos do que todos os controles.

Em geral, plantas infectadas por fitopatógenos sofrem um aumento no conteúdo de proteínas, quando comparadas com plantas não infectadas. Esse aumento pode ser explicado em função dos mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, no que diz respeito a ação do patógeno na planta e a resposta da planta frente a esse ataque. A planta, de um lado, procura ativar seus mecanismos de defesa para evitar o estabelecimento de relações parasitárias e o patógeno, por outro lado, tenta anular os efeitos inibitórios gerados pelo hospedeiro (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Além disso, é comum observar o acúmulo de proteínas nas chamadas ilhas verdes, representadas pelas áreas em torno dos sítios de infecção, enquanto que nas áreas cloróticas observa-se um declínio (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Segundo LINTHORST (1991) a infecção de plantas por microrganismos fitopatogênicos é acompanhada por um aumento da síntese de um grande número de proteínas. Estas proteínas induzíveis pertencem a um grupo conhecido como proteínas-PR. Além disso, quando o ácido salicílico (AS), salicilato e seus análogos são aplicados de forma exógena nas plantas, são capazes de induzir um aumento da síntese do próprio ácido salicílico nos tecidos vegetais (REPKA et al., 2001). Isto é resultante do aumento da atividade de enzimas da via dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase (FAL), através do qual o AS é sintetizado, podendo induzir a produção de proteínas-PR e, conseqüentemente, proteger as plantas contra o ataque de patógenos (SPLETZER & ENYEDI, 1999).

Na presente pesquisa, aos 80 e 100 dias foram observados aumentos significativos no conteúdo de proteínas totais em plantas do tratamento Bion + inseto infectivo, sendo esses valores significativamente superiores àqueles dos tratamentos FSC + inseto infectivo e aos do controle positivo C+ (H₂O + inseto infectivo). Isto pode ser explicado em função do Bion ser um composto sintético análogo ao ácido salicílico (KATZ et al., 1998; KOHLER et al., 2002), aumentando assim a síntese do próprio ácido salicílico nos tecidos vegetais das plantas de milho, induzindo a produção de proteínas-PR (SPLETZER & ENYEDI, 1999).

De acordo com GOELLNER & CONRATH (2008), o Bion[®] (Acibenzolar-S-metílico) apresenta uma atividade protetora e não curativa. A atividade protetora deste produto pode estar possivelmente ligada a indução de mecanismos de defesa da planta.

Com relação à taxtamina, embora neste estudo não tenha sido utilizada de forma parcialmente purificada, mas utilizou-se o filtrado da suspensão de células da bactéria *S. scabies* (FSC), que contém este composto em concentração inferior, não se sabe muito sobre os mecanismos de ação, pois, para cada patossistema podem variar em função da planta e concentração utilizadas (BRAND, 2016).

No entanto, em um estudo com plântulas de citros, BRAND (2016) verificou que a taxtomina parcialmente purificada ($100 \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$) e o Acibenzolar-S-metílico foram capazes de aumentar a atividade da enzima β -1,3 glucanase nas folhas. Além disso, em outro estudo, GARCIA et al. (2008b), verificaram que a taxtomina purificada foi capaz de aumentar a atividade das enzimas peroxidase, quitinase e β -1,3 glucanase, reduzindo em 80% a severidade de *Colletotrichum sublineolum*.

Figura 10: Conteúdo de proteínas totais em folhas de milho híbrido suscetível MG300 coletadas 0, 20, 40, 80 e 100 dias após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho, 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão.

Os dados revelaram as maiores médias para o conteúdo de proteínas totais em plantas de milho para o tratamento Bion + inseto infectivo e os controles Bion + H₂O e H₂O + inseto não infectivo, não havendo diferenças significativas entre eles (Figura 11). Dentre as proteínas-RP, produzidas pelas plantas hospedeiras, encontram-se as β -1,3 glucanases, quitinases e peroxidases. É possível que o aumento dessas proteínas nos tratamentos deste estudo tenha contribuído para o aumento nos níveis de proteínas totais. A pulverização das plantas com o

Acibenzolar-S-metílico proporcionou um aumento significativo no conteúdo de proteínas totais, no entanto, não foi suficiente para minimizar os danos provocados pelo patógeno.

Em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho JUNQUEIRA (2003) também observou aumentos no conteúdo de proteínas totais em híbridos suscetível e híbridos resistentes. Sendo os maiores conteúdos obtidos em híbridos resistentes.

Figura 11: Conteúdo médio de proteínas totais em avaliações feitas em cinco períodos a partir de folhas de milho híbrido suscetível MG300, após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento do milho, 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion[®] 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si no teste Scott-Knott a $p \leq 0,05$. As barras nas colunas representam o erro padrão.

4.1.3.5. Atividade da enzima guaiacol peroxidase

Comparando-se os tratamentos dentro de cada período (0, 20, 40, 80 e 100 dias após a pulverização do ASM ou do FSC) foi possível observar que somente houve diferença significativa em relação à atividade da enzima guaiacol peroxidase aos 80 dias após a pulverização dos potenciais indutores (Figuras 12 e 13). A atividade desta enzima nas plantas do controle FSC + H₂O foi significativamente maior do que em todas as outras plantas dos tratamentos e controles. O tratamento FSC + inseto infectivo teve o segundo maior valor da atividade dessa enzima, sendo significativamente distinto do controle FSC + H₂O. A atividade dessa enzima no tratamento Bion + inseto infectivo não foi significativamente distinta do controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo). Os maiores valores observados na atividade da guaiacol peroxidase nesse período de avaliação foi para Bion + H₂O, meio + H₂O e H₂O + inseto não infectivo. Curiosamente, estes tratamentos controles foram os que apresentaram os maiores conteúdos de proteínas totais aos 80 dias após a pulverização do ASM ou do FSC. Apesar do aumento do conteúdo protéico nos tecidos das plantas desses tratamentos controles (Figuras 12 e 13), individualmente, algumas proteínas podem sofrer diminuição na sua concentração, como foi verificado para a atividade da guaiacol peroxidase neste estudo. VILLANUEVA, citado por LEÓN et al. (1996), observou um decréscimo de polipeptídeos em folhas de palmeiras com amarelecimento letal (LY). Aquele autor destacou que um destes polipeptídeos poderia ser uma grande subunidade da ribulose bifosfato carboxilase (rubisco), uma enzima chave do ciclo na fixação de CO₂ e que constitui 50% ou mais do total de proteínas solúveis da folha.

Neste estudo não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento Bion + inseto infectivo e o controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo) em nenhum dos tempos avaliados. Esses resultados estão em desacordo com aqueles obtidos por CAVALCANTI et al. (2006), onde observaram que a aplicação do Acibenzolar-S-metílico em plantas de tomateiro foi capaz de elevar os níveis da atividade de peroxidases e oxidases de polifenóis que podem estar envolvidas no processo de lignificação. Os autores verificaram ainda que a atividade de peroxidases iniciava poucas horas após a aplicação e persistia por até 12 dias após a aplicação do produto. Neste estudo, apenas uma única aplicação dos potenciais indutores foi realizada e observou-se um decréscimo, entre 0 – 20 dias após a sua aplicação, na atividade da enzima peroxidase, ocorrendo um aumento para todos os tratamentos entre os 20 - 40 dias após. Neste mesmo período, entre 20 – 40 dias após a aplicação dos potenciais indutores, as plantas de milho tiveram a presença do fitoplasma confirmada pela primeira vez. Estudos futuros focados

em avaliar o número de aplicações de potenciais indutores em plantas de milho, com uma segunda aplicação aos 20 – 40 dias após a inoculação do fitoplasma nas plantas, talvez seriam interessantes na tentativa de aumentar a atividade dessa enzima nos tecidos e, conseqüentemente, evitar os efeitos negativos da infecção pelo fitoplasma.

Mesmo observando-se os níveis elevados da atividade da guaicol peroxidase nos tratamentos Bion + inseto infectivo e FSC + inseto infectivo, esses não foram suficientes para minimizar os efeitos do patógeno sobre o desenvolvimento normal das plantas.

Diversas são as atividades da enzima peroxidase, como a sua atuação na oxidação de compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção, na biossíntese de hormônio vegetal etileno e também na síntese de lignina (ASADA, 1992). De acordo com LEHERER (1969), a atividade de peroxidase pode estar relacionada à resposta de defesa da planta. No entanto, a sua atividade pode ser alterada em função da resistência ou suscetibilidade de diferentes hospedeiros na presença de diferentes patógenos (ASADA, 1992). Comparando-se os níveis da atividade desta enzima em dois híbridos de milho (suscetível e resistente) com o enfazamento vermelho, JUNQUERIA (2003) encontrou maiores acúmulos nos níveis dessa enzima em híbridos suscetíveis do que em híbridos resistentes. Neste trabalho esse autor avaliou apenas alterações quantitativas e acrescentou que para tentar estabelecer o envolvimento desta enzima no mecanismo de resistência das plantas de milho ao fitoplasma, seria interessante avaliar o perfil das diferentes isoenzimas de peroxidases em cultivares resistentes e suscetíveis, uma vez que as diferentes isoformas, estão relacionadas a diferentes funções. Essas informações poderiam explicar o fato de que o aumento dos níveis da atividade desta enzima não teve efeito sobre a doença.

Figura 12: Atividade da enzima guaiacol peroxidase em folhas de milho híbrido suscetível MG300 coletadas 0, 20, 40, 80 e 100 dias após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho, 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão.

Os maiores níveis de atividade da guaiacol peroxidase foram observados para FSC + H₂O; com níveis intermediários para H₂O + H₂O, FSC + inseto infectivo e Bion + inseto infectivo; os menores níveis foram observados em H₂O + inseto infectivo, Bion + H₂O, meio + H₂O e H₂O + inseto não infectivo (Figura 13).

Figura 13: Atividade média da guaiacol peroxidase dos cinco períodos avaliados em folhas de milho híbrido suscetível MG300, após a pulverização com o acibenzolar-S-metílico (ASM) ou com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho, 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram: pulverização das plantas de milho com o filtrado da suspensão de células (FSC) de *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (FSC + H₂O); pulverização do FSC + confinamento da cigarrinha infectiva (FSC + inseto infectivo); pulverização do acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion® 50 WG – Syngenta) + não confinamento da cigarrinha (Bion + H₂O); pulverização do ASM + confinamento da cigarrinha infectiva (Bion + inseto infectivo). Os controles foram: Controle positivo (C⁺) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha infectiva (H₂O + inseto infectivo); Controle negativo (C⁻) = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si no teste Scott-Knott a $p \leq 0,05$. As barras nas colunas representam o erro padrão.

4.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO DO FILTRADO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS (FSC) DA BACTÉRIA *Streptomyces scabies* E DO PRODUTO COMERCIAL ACIBENZOLAR-S-METÍLICO (ASM) NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.) INFECTADAS COM O FITOPLASMA DO ENFEZAMENTO VERMELHO

4.2.1. Impacto da aplicação de indutores de resistência no crescimento e na produção de plantas de milho

Os sintomas observados nas plantas do segundo experimento foram idênticos àqueles presentes nas plantas do primeiro experimento, ou seja, clorose e avermelhamento das folhas, lâmina foliar aparentemente mais fina quando comparada com uma planta sadia, folhas novas torcidas, redução do tamanho da planta e no sistema radicular, encurtamento dos entrenós e afinamento do colmo, espigas com tamanho reduzido, poucos grãos e distribuição dos grãos de forma desordenada nas espigas (Figura 14). Os controles não exibiram sintomas aparentes. Os primeiros sintomas, neste experimento, também foram observados entre 20-30 dias após a inoculação do patógeno pelo vetor *D. maydis*.

Figura 14: Lâmina foliar, caule, raiz e espiga de plantas de milho híbrido suscetível MG300 infectadas com o fitoplasma no experimento 2. A – Lâmina foliar com sintomas de clorose e avermelhamento, B – Plantas de milho com encurtamento dos entrenós, afinamento do colmo e folhas mais novas torcidas, C – Sistema radicular com tamanho reduzido e D – Grãos distribuídos de forma irregular na espiga oriunda de planta infectada com o fitoplasma.

A detecção do fitoplasma em plantas de milho híbrido suscetível MG300, pela análise de amostras provenientes de tecido foliar coletadas no final do ciclo vegetativo da cultura, confirmou a presença do fitoplasma nos tratamentos FSC + inseto infectivo, Bion + inseto infectivo e H₂O + inseto infectivo. O patógeno foi revelado por meio da visualização, em gel de agarose 1%, de bandas de aproximadamente 1,2 kb, amplificadas por duplo PCR com a utilização dos

iniciadores universais R16 mF2/mR1 e R16 F2n/R2, correspondentes ao 16S rDNA. Os tratamentos H₂O + H₂O, H₂O + inseto não infectivo, Meio + H₂O, Bion + H₂O e FSC + H₂O, não testaram positivo para o fitoplasma.

A pulverização dos potenciais indutores não teve efeito em minimizar os danos provocados pelo patógeno nas plantas de milho. Estas informações estão de acordo com aquelas encontradas por AGNELLI (2011), que estudou o potencial de vários agentes indutores de resistência, tais como o ácido jasmônico, ácido gentísico, Bion®, Ecolife®, Agromos®, metil jasmonato, peróxido de hidrogênio, ácido salicílico e Bion® combinado com peróxido de hidrogênio, para o controle da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas. Este autor verificou que não houve efeito dos tratamentos sobre o tipo e intensidade de sintomas e somente o Bion® retardou o número de plantas cítricas infectadas pela bactéria. Este efeito, segundo o autor, foi diretamente proporcional à quantidade do produto aplicado, o qual apresentou duração limitada. Esta informação aponta para a necessidade de testar as diferentes concentrações, espaçamento entre aplicações e número de aplicações de potenciais indutores de resistência para que resultados mais confiáveis e eficazes possam ser obtidos em estudos futuros.

4.2.2. Efeito do ASM e do FSC de *S. scabies* na altura de plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho

Plantas de milho inoculadas com o fitoplasma apresentaram altura significativamente inferior àquela obtida para as plantas não inoculadas (Figuras 15 e 16). Não houve diferenças significativas na altura de plantas entre os tratamentos Bion + inseto infectivo e FSC + inseto infectivo. Embora o tratamento Bion + H₂O tenha sido significativamente inferior a FSC + H₂O, não houve diferença significativa entre Bion + H₂O e o controle negativo C⁻ (H₂O + H₂O). Os tratamentos FSC + inseto infectivo e Bion + inseto infectivo apresentaram os menores valores para a altura de plantas, demonstrando que parece existir um gasto energético da planta em ativar os mecanismos de defesa, somado à ação do patógeno, pois, estes dois tratamentos foram significativamente inferiores ao controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo).

Figura 15: Altura das plantas (cm) de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC+H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Figura 16: Visão geral da altura das plantas de milho híbrido suscetível MG300 aos 100 dias após a pulverização dos produtos. A – Da esquerda para a direita: tratamentos H₂O + inseto não infectivo; Meio aveia + H₂O; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; FSC + H₂O; FSC + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo e H₂O + H₂O. B – Visão ampliada dos tratamentos H₂O + inseto infectivo e H₂O + H₂O (da esquerda para a direita).

4.2.3. Efeito do ASM e do FSC de *S. scabies* no número de folhas por plantas, em plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho

O número de folhas por planta não diferiu significativamente entre plantas inoculadas e não inoculadas com o fitoplasma, independentemente se foram ou não tratadas com o ASM ou FSC de *S. scabies* (Figura 17). Isto demonstrou que a aplicação dos agentes indutores na concentração utilizada e por via foliar, não interferiu no número de folhas por planta. Vale ressaltar que, mesmo não ocorrendo alteração no número de folhas por planta, a altura das plantas foi significativamente reduzida quando houve infecção pelo fitoplasma (Figura 16), evidenciando que o encurtamento dos internódios ocorreu, mas a emissão das folhas ainda permanece normal.

Figura 17: Número de folhas por planta de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC + H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *Streptomyces scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

4.2.4. Efeito do ASM e do FSC de *S. scabies* no diâmetro do caule em plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho

Plantas pulverizadas com o ASM ou com o FSC de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma apresentaram os menores valores médios de diâmetro do caule (Figura 18). Ambos os tratamentos apresentaram resultados significativamente menores do que o controle positivo C+ (H₂O + inseto infectivo). O diâmetro do caule no tratamento Bion + H₂O foi significativamente distinto do tratamento FSC + H₂O, no entanto, não houve diferença significativa entre o tratamento Bion + H₂O e os controles H₂O + H₂O e Meio + H₂O. O tratamento FSC + H₂O não diferiu significativamente do tratamento H₂O + inseto infectivo e H₂O + inseto não infectivo. Esses últimos dados revelaram que a aplicação do FSC de *S. scabies* nas plantas de milho, bem como, a alimentação das cigarrinhas não infectivas, provocam um

efeito nas plantas semelhante ao do controle positivo. Este resultado pode ser provavelmente atribuído ao gasto energético mobilizado pela planta para se defender de agentes externos (vetor) e no reconhecimento de alguma molécula presente no potencial agente indutor que levou a mudanças bioquímicas nas células, como foi observado para algumas características no experimento 1.

Figura 18: Diâmetro do caule (cm) de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC + H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (meio de aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

4.2.5. Efeito do ASM e do FSC de *S. scabies* na massa seca das folhas produzidas por plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho

Plantas de milho tratadas com o FSC de *S. scabies* ou ASM e inoculadas com o fitoplasma apresentaram massa seca das folhas significativamente inferior ao das plantas não inoculadas, independentemente se foram ou não pulverizadas com os agentes indutores (Figura

19). A aplicação dos tratamentos Bion + H₂O e FSC + H₂O sobre o tecido foliar das plantas não provocou alteração significativa na massa seca das folhas, revelando que a alteração na massa seca das folhas parece estar mais relacionada à presença do patógeno do que ao efeito do agente indutor testado, uma vez que esses dois tratamentos não diferiram significativamente dos controles H₂O + H₂O, Meio aveia + H₂O e H₂O + inseto não infectivo. O valor máximo obtido para a massa seca das folhas foi 35,84 g (Meio + H₂O). A menor média da massa seca das folhas obtida neste experimento foi 25,39 g (FSC + inseto infectivo).

Figura 19: Massa seca das folhas (g) de plantas de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC +H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

4.2.6. Efeito do ASM e do FSC de *S. scabies* na massa seca do caule de plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho

Comportamento semelhante ao da massa seca das folhas foi observado para a massa seca do caule, ou seja, as plantas pulverizadas com os agentes indutores e inoculadas com o fitoplasma tiveram a massa do caule (g) significativamente inferior à massa das plantas não inoculadas com o patógeno, independentemente se foram ou não pulverizadas com os potenciais indutores (Figura 20). A aplicação do FSC de *S. scabies* ou do ASM não provocou alterações na massa seca do caule de plantas não infectadas pelo patógeno. O maior valor médio da massa seca do caule, neste experimento, foi de 31,09 g obtida no tratamento H₂O + H₂O, enquanto que o menor valor foi de 11,58 para o tratamento FSC + inseto infectivo.

Figura 20: Massa seca do caule (g) de plantas de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC +H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *Streptomyces scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

4.2.7. Efeito do ASM e do FSC de *S. scabies* na massa seca do sistema radicular de plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho

As plantas pulverizadas com ASM ou FSC de *S. scabies* e inoculadas com o fitoplasma apresentaram os menores valores da massa seca de raízes (g) (Figura 21). As médias da massa seca de plantas de cada um desses tratamentos diferiram significativamente dos tratamentos H₂O + H₂O, FSC + H₂O, Meio aveia + H₂O, Bion + H₂O e H₂O + inseto não infectivo. Além disso, o tratamento Bion + H₂O nas plantas de milho diferiu significativamente do tratamento FSC + H₂O. No entanto, o tratamento Bion + H₂O não foi significativamente distinto do controle negativo (H₂O + H₂O). Da mesma forma, FSC + H₂O foi significativamente semelhante a H₂O + inseto não infectivo, no que diz respeito a massa seca de raízes. Assim, como no caso do diâmetro de caule, os mecanismos de defesa da planta ativados, provavelmente, provocaram mudanças no metabolismo das plantas que afetaram as suas raízes. Isto não foi observado para Bion + H₂O.

Figura 21: Massa seca do sistema radicular (g) de plantas de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC+H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Os resultados da avaliação do sistema radicular de plantas inoculadas e não inoculadas com o fitoplasma e pulverizadas ou não com os agentes indutores estão apresentadas na figura 22.

Figura 22: Sistema radicular de plantas de milho híbrido suscetível MG300. A – Esquerda para a direita, raízes de planta de milho oriunda do tratamento Meio + H₂O e raízes proveniente do tratamento FSC + inseto infectivo, B – Esquerda para a direita, raízes de planta de milho do tratamento Bion + inseto infectivo e raízes de planta do tratamento Bion + H₂O, C – Raízes do tratamento Meio + H₂O ainda com o solo, demonstrando o crescimento radicular até a base do saco plástico usado para mudas, D – Raízes de planta infectada com o fitoplasma e E – Raízes de planta do tratamento FSC + inseto infectivo com crescimento volumoso na superfície, mas não no sentido de profundidade.

4.2.8. Efeito do ASM e do FSC de *S. scabies* na massa seca das espigas, massa seca de sementes e massa seca de sabugos produzidos por plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho

Os tratamentos apresentaram tendências similares para estas variáveis (Figuras 23, 24 e 25). Houve diferenças significativas entre plantas inoculadas e não inoculadas, sendo que as primeiras apresentaram os menores valores para as três variáveis analisadas. Além disso, observou-se um efeito negativo do Bion + H₂O na massa seca da espiga e na massa seca das sementes, mas não na massa do sabugo.

O tratamento Bion + H₂O provocou um efeito negativo sobre a massa seca da espiga, não sendo observadas diferenças significativas com as plantas infectadas pelo patógeno. A pulverização do FSC de *S. scabies*, sem a inoculação do patógeno, não reduziu significativamente a massa seca da espiga quando comparada aos tratamentos H₂O + H₂O, Meio aveia + H₂O e H₂O + inseto não infectivo, demonstrando que a aplicação deste potencial agente indutor, nas condições em que foi realizada, não afeta negativamente essa variável.

Figura 23: Massa seca da espiga (g) de plantas de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC+H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Os maiores valores médios da massa seca das sementes foram observados para os tratamentos FSC + H₂O, H₂O + H₂O, Meio aveia + H₂O e H₂O + inseto não infectivo (Figura 31). Os valores médios da massa seca das sementes neste experimento ficaram entre 12,22g (Bion + inseto infectivo) a 102, 57g (H₂O + inseto não infectivo (Figura 31).

Figura 24: Massa seca das sementes (g) de plantas de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC + H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio de aveia líquido sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Para a massa seca do sabugo, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos FSC + inseto infectivo, Bion + inseto infectivo e H₂O + inseto infectivo, sendo a massa seca obtida para cada um desses tratamentos igual a 2,84 g, 2,38 g e 5,10 g, respectivamente. Plantas de milho híbrido pulverizadas com FSC + H₂O ou Bion + H₂O não diferiram significativamente das plantas dos tratamentos H₂O + H₂O, Meio + H₂O e H₂O + inseto não infectivo, indicando que a pulverização desses produtos nas plantas não alterou a massa seca do sabugo.

Figura 25: Massa seca sabugo (g) de plantas de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC +H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio aveia líquido sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

4.2.9. Efeito do ASM e do FSC de *S. scabies* no número de espigas por planta, comprimento e diâmetro da espiga em plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho

Não houve uma distinção entre plantas inoculadas e não inoculadas em relação ao número de espigas por planta (Figura 26). Por outro lado, plantas pulverizadas com o ASM e que não foram inoculadas apresentaram a média do número de espigas superior às plantas pulverizadas com ASM e inoculadas com o patógeno. No entanto, o tratamento Bion + H₂O não foi significativamente distinto do controle negativo C⁻ (H₂O + H₂O), demonstrando que a aplicação do Bion não afetou o número médio de espigas por planta.

Figura 26: Número de espiga por planta proveniente de plantas de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC+H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *Streptomyces scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Em relação ao comprimento das espigas, verificou-se que as plantas inoculadas e pulverizadas com o ASM ou FSC de *S. scabies* apresentaram os menores comprimentos (cm). Estes tratamentos não foram significativamente distintos do controle positivo C⁺ (H₂O + inseto infectivo) (Figura 27). Somente a aplicação do FSC de *S. scabies* ou do ASM nas plantas não provocou alterações no comprimento da espiga. Os tratamentos FSC + H₂O e Bion + H₂O, não foram significativamente distintos dos tratamentos H₂O + H₂O, Meio + H₂O e H₂O + inseto não infectivo. A maior média do comprimento da espiga foi de 15,7 cm (H₂O + H₂O). Por outro lado, o menor valor foi de 8,73 cm (Bion + inseto infectivo).

Figura 27: Comprimento da espiga (cm) provenientes de plantas de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC +H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio aveia líquido sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Para o diâmetro da espiga, as plantas que foram inoculadas com o fitoplasma e pulverizadas com o ASM ou com o FSC de *S. scabies* apresentaram o diâmetro da espiga (cm) significativamente inferior àqueles obtidos para os demais tratamentos analisados (Figura 28). É importante ressaltar que esses dois tratamentos apresentaram diferenças significativas dos tratamentos que receberam apenas o ASM ou o FSC de *S. scabies*, sem a inoculação do patógeno. A aplicação do ASM provocou uma redução significativa no diâmetro da espiga, quando em comparação com os tratamentos H₂O + H₂O, FSC + H₂O, Meio + H₂O e H₂O + inseto não infectivo. O tratamento Bion + H₂O não foi significativamente distinto de H₂O + inseto infectivo.

Figura 28: Diâmetro de espigas (cm) provenientes de plantas de milho híbrido suscetível MG300 nos diferentes tratamentos FSC+H₂O; FSC + inseto infectivo; Bion + H₂O; Bion + inseto infectivo; H₂O + inseto infectivo; Controle negativo = pulverização com água + não confinamento da cigarrinha (H₂O + H₂O); Controle do inseto vetor (CIV) = pulverização com água + confinamento da cigarrinha não infectiva (H₂O + inseto não infectivo); Controle do meio de cultivo da bactéria *S. scabies* (CMA) = pulverização do meio líquido de aveia sem *S. scabies* + não confinamento da cigarrinha (Meio aveia + H₂O). As barras representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em cima das barras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância $p < 0,05$.

Um aspecto geral do efeito dos indutores e do patógeno sobre o comprimento e diâmetro de espigas, bem como sobre a distribuição das sementes nas espigas pode ser visualizado na ilustração da figura 29.

Figura 29: Espigas oriundas de plantas de milho híbrido suscetível MG300 inoculadas ou não com o fitoplasma do enfezamento vermelho. A – Esquerda para a direita, H₂O + inseto infectivo e H₂O + inseto não infectivo, B – Esquerda para a direita, Bion + inseto infectivo e Bion + H₂O, C – Esquerda para a direita, FSC + inseto infectivo e FSC + H₂O, D – Esquerda para a direita, H₂O + H₂O e Meio aveia + H₂O.

Em termos gerais, referentes ao experimento 2 que tratou dos efeitos da aplicação de indutores de resistência no crescimento e na produção de plantas de milho, foi observado que a altura de plantas inoculadas com o fitoplasma foi significativamente menor em relação às plantas não inoculadas. Além disto, plantas que receberam os tratamentos Bion + inseto infectivo e FSC + inseto infectivo apresentaram as menores alturas. Os resultados obtidos para a altura de plantas nos tratamentos que receberam o confinamento das cigarrinhas infectivas eram previsíveis, pois a redução na altura de plantas é um sintoma característico da doença (BEDENDO, 1999; NAULT, 1980). No entanto, o efeito severo da doença decorrente da aplicação dos potenciais indutores e a infecção do fitoplasma, provavelmente, pode ser atribuído ao gasto energético da planta dirigido para a indução dos mecanismos de resistência somado aos danos causados pelo patógeno. Este tipo de efeito foi relatado também para o feijoeiro tratado com ASM (KUHN, 2007). Nesta leguminosa, o ASM alterou o metabolismo das plantas, gerando um custo metabólico e redirecionando os fotoassimilados para investir em defesas, a custo da redução do crescimento e produtividade da planta.

Durante a infecção pelo fitoplasma, a translocação dos fotoassimilados é severamente afetada e o acúmulo de amido nas folhas pode resultar em bloqueio dos vasos do floema (MUSETTI et al., 2013; SANTI et al., 2013). Sendo assim, a diminuição na altura, redução no diâmetro do caule, menor massa seca das folhas, caule e raízes, bem como as alterações nas espigas e grãos pode ser creditada às alterações fisiológicas ocorrida nos vasos de seiva elaborada. O floema é o local colonizado pelo patógeno e danos ao funcionamento deste sistema de vasos pode ter como consequência, a inibição na translocação de fotoassimilados dos órgãos fonte para os órgãos dreno, afetando o crescimento das plantas e as variáveis de produção.

Neste trabalho, observou-se que plantas infectadas por fitoplasmas apresentavam menores conteúdos de clorofila total e um aumento no conteúdo de açúcares, em relação aos controles. Isto vem de encontro com a suposição do bloqueio dos vasos do floema na translocação dos fotoassimilados. Segundo SANTI et al. (2013), após a entrada do fitoplasma na planta, o patógeno se concentra principalmente nas folhas, e em menor concentração a partir dos pecíolos. Isto provoca necroses nos elementos do floema, deposição anormal de calose nos tubos crivados, acúmulo de amido nas plantas suscetíveis e espessamento da parede celular. Em plantas de *Vitis vinefera* infectada pelo fitoplasma da flavescência dourada (FD), OLIVEIRA et al. (2020) verificaram que a infecção por este patógeno retarda o desenvolvimento da videira e leva a perdas drásticas de produção, que podem estar parcialmente ligadas às modificações ultraestruturais observadas nas células do floema de plantas infectadas. Essas mudanças provocadas nas plantas infectadas comprometem significativamente as variáveis de produção, como foi relatado por TOFFANELLI (2001) que trabalhou com o patossistema milho-fitoplasma. O referido autor relatou que a presença do patógeno reduziu significativamente a altura de plantas, tamanho de espigas, número de fileiras de grãos por espigas, número de grãos por plantas, peso de mil grãos e produção de grãos por planta. Ainda foi demonstrado que os efeitos negativos causados sobre estes componentes de produção são proporcionais ao número de cigarrinhas infectivas que se alimentam na planta.

Na presente investigação, poucas diferenças foram observadas nos tratamentos onde foi aplicado o ASM ou o FSC de *S. scabies*. As mudanças observadas em cada uma das variáveis analisadas, sejam elas bioquímicas ou nos fatores de produção, parecem ter sido mais influenciadas pela presença dos fitoplasmas nas plantas e pouco pela ação dos indutores de resistência. De qualquer forma, neste estudo não foram observados efeitos positivos da aplicação dos potenciais indutores em minimizar o impacto da doença. Sugere-se que em estudos futuros diferentes concentrações sejam testadas, bem como a frequência de aplicações para que informações mais concretas possam ser obtidas e usadas no manejo mais eficiente da doença.

5. CONCLUSÕES

A aplicação do ASM ou do FSC de *S. scabies* nas plantas de milho não provocou atraso na detecção do fitoplasma;

O tratamento do ASM promoveu um aumento significativo no conteúdo de proteínas totais nas plantas de milho;

Os maiores conteúdos de fenóis livres foram observados nas plantas de milho que receberam a aplicação do FSC de *S. scabies* e foram inoculadas com o fitoplasma;

Os maiores conteúdos de açúcares redutores e fenóis ligados foram constatados em plantas inoculadas com o fitoplasma, independentemente, se receberam ou não o tratamento com o ASM ou o FSC de *S. scabies*;

Os menores conteúdos de açúcares totais foram observados em plantas de milho dos controles ASM, FSC de *S. scabies* e meio líquido de aveia, demonstrando que o tratamento com um desses compostos promoveu alterações no metabolismo da planta;

A infecção pelo fitoplasma alterou o conteúdo de clorofila total nas plantas de milho;

A redução no conteúdo de clorofila total e aumento do conteúdo de açúcares redutores em plantas infectadas são indicativos de bloqueio dos vasos do floema e, consequentemente, redução na translocação de fotoassimilados;

A utilização do ASM ou do FSC de *S. scabies* não minimizou os efeitos negativos da ação do fitoplasma no crescimento e na produção de plantas de milho;

A aplicação do ASM e do FSC de *S. scabies*, somados à infecção pelo fitoplasma, reduziram significativamente o diâmetro do caule e da espiga, indicando gasto energético devido a mudanças no metabolismo dos açúcares totais, proteínas totais e fenóis livres, observados através do acúmulo de cada uma dessas variáveis.

REFERÊNCIAS

AGNELLI, A. R. Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas. Master's thesis, Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, 2011.

AHMED, E. A.; SHALABY, O. Y.; DWIDAR, E. F.; MOKBEL, S. A.; EL-ATTAR, A. K. Ultrastructural changes in tomato plant induced by phytoplasma infection and attempts for its elimination using tissue culture techniques. *Egyptian J. Virol.*, Vol. 13 (1): 34- 51, 2016.

ALMEIDA, A. C. De S.; SILVA, L. P.; JESUS De, F. G.; NOGUEIRA, L.; NETO, M De. S.; CUNHA Da, P. C. R. Efeito de indutores de resistência em híbridos de milho na atratividade do pulgão *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae). *Revista Agrarian*, v.8, n.27, p.23-29, Dourados, 2015.

ALTSTATT, G. E. A new corn disease in the Rio Grande Valley. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, v.29, p.533-534, 1945.

AMMAR, E.D.; GASPARICH, G.E.; HALL, D.G.; HOGENHOUT, S.A. Spiroplasma-like organisms closely associated with the gut in five leafhopper species (Hemiptera: Cicadellidae). *Arch. Microbiol.* v. 193, p. 35-44, 2011.

ANWAR, M.; MAJUMDER, S.K.; SHETTY, H.S. Changes in phenolic acids in sorghum and maize with *Peronosclerospora sorghi*. *Indian Phytopathology*, v. 48, n.1, p.21-26, 1995.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase-scavenging enzyme in plants. *Physiological Plantarum*, v. 85, p. 235-241, 1992.

BABCOCK, M. J.; ECKWALL, E. C.; SCHOTTEL, J. L. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *J Gen Microbiol*, v. 139, pp. 1579-1586, 1993.

BALLESTER, A-R., LAFUENTE, M.T., DE VOS R.C.H., et al. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits. *Food Chem* 136:178-185, 2013.

BARROS, R. Estudo sobre a aplicação foliar de acibenzolar-s-metil para a indução de resistência à ferrugem asiática em soja e cercosporiose em milho. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 78, n. 4, p. 519-528, 2011

BEDENDO, I.P. Micoplasmas e espiroplasmas de plantas: importância, diagnose, detecção e identificação. Summa Phytopatologica, Botucatu, v.21, p.84-85, 1995.

BEDENDO, I. P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Molecular evidence for the presence of maize bushy stunt phytoplasma in corn in Brazil. Plant Disease, v.81, p.957, 1997.

BEDENDO, I.P. Enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho associados a fitoplasma e espiroplasma: sintomatologia, etiologia e técnicas para detecção e identificação destes agentes. Summa Phytopathologica, v.25, n.3, p.190-196, 1999.

BEDENDO, I. P. Fitoplasmas e espiroplasmas. In: Amorim L; Rezende J.A.M.; Bergamin Filho, A. (eds) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos, 5th edn. Editora Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, pp 424-450, 2018a.

BERTACCINI, A.; DUDUK, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recente research. Phytopathologia Mediterranea, Bologna, v. 48, p. 355-378, 2009.

BORIN, R. C.; POSSENTI, J. C.; REY, M. Dos S.; Mazaro, S. M.; BERNARDI, C.; SABURO, R. S. S. Desempenho fisiológico e indução de resistência de sementes de milho tratadas com fungicidas associados a fertilizantes a base de fosfitos. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v. 5, n. 12, p. 33321-33338, dez. 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, S. C. Taxtomina A e *Piriformospora indica* no controle de *Phytophthora nicotianae* em citros e *Phytophthora plurivora* em faia (*Fagus sylvatica*). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

BRAY, H. G.; THORPE, W. V. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolismo. Methods Biochem Anal, v. 1, pp. 27-52, 1954.

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: Amorim L; Rezende J.A.M.; Bergamin Filho, A. (eds) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos, 5th edn. Editora Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, pp 85-92, 2018.

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., ZACARONI, A.B., et al. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). Fitopatol Bras 31:372-380, 2006.

CHAOLING, X.; ZHIGUO, L.; LI, D.; JIAODI, B.; MENGJUN, L.; ZHIHUI, Z.; ZIHUI, J.; WEILIN, G.; JIN, Z. Changing Host Photosynthetic, Carbohydrate, and Energy Metabolisms Play Important Roles in Phytoplasma Infection. Phytopathology Sep;108(9):1067-1077, 2018.

CHOI, Y. H; TAPIAS, E. C.; KIM, H.K.; LEFEBER, A. W. M.; ERKELENS, C.; VERHOEVEN, J. T. J.; BRZIN, J.; ZEL, J.; VERPOORTE, R. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using H-1-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. Plant Physiol 135:2398–2410, 2004.

CONAB. 2019. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2019. Brasília: Conab, 2019. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 10 de maio de 2020.

CONAB. 2020. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento, julho. Brasília: Conab, 2019. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 30 de julho de 2020a.

CONAB. 2020. Companhia Nacional de Abastecimento. Série histórica da safra brasileira: Safras 1976/77 a 2019/20. Brasília: Conab, 2020. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 03 de agosto de 2020b.

COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W; ARRUDA, S. C. Moléstia de vírus e de micoplasma do milho em São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Brasília, v.4, n.4, p.39-41, 1971.

CRUZ, J. C.; SILVA DA, G. H.; FILHO, I. A. P.; NETO, M. M. G.; MAGALHÃES, P. C. Caracterização do cultivo de milho safrinha de alta produtividade em 2008 e 2009. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 9, n.2, p.177-188, 2010.

DALLAGNOL, L.J.; Navarini, L.; Ugalde, M. G. et al. Utilização de Acibenzolar-S-Methyl para controle de doenças foliares da soja. Summa Phytopathol 32, p.255-259, 2006.

DAVIS, R.E. Fitoplasmas: fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodos. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v.3, n.1, p.1-27, 1995.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry, New York, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUARTE, A. P. Manejo da cultura: Milho safrinha se consagra e caracteriza um sistema peculiar de produção. Visão Agrícola. Versão Eletrônica – USP Esalq ano 9, jul/dez, p.78-82, 2015.

EGEA, C., AHMED, A. S.; CANDELA, M., CANDELA, M.E. Elicitation of peroxidase activity and lignina biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. J. Plant Physiol 158:151-158, 2001.

ENDESHAW, S.T., MUROLO, S., ROMANAZZI, G.EMAIL AUTHOR, NERI, D. Effects of Bois noir on carbon assimilation, transpiration, stomatal conductance of leaves and yield of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. Chardonnay Physiol. Plant., 145, pp. 286-295, 2012.

EMBRAPA. 2010. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo do Milho. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo. Versão Eletrônica – 6º edição. Setembro/2010. (Sistema de Produção, 2).

EMBRAPA. 2017. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção vegetal/ Manejo Integrado de Pragas: Enfezamento do milho aparece como problema nesta safra. Abril/2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/21567441/enfezamento-do-milho-aparece-como-problema-nesta-safra>>.

FAO. 2018. FAOSTATS: CROPS. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acessado em 11 de maio, 2020.

FERNANDES, C. De. F.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; Da SILVA, D. S. G.; REIS, N. D.; ANTUNES JÚNIOR, H. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. Versão Eletrônica. Setembro, 2009. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/>.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERRY, N., EDWARDS, M.G., GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. Current Opinion in Biotechnology, London, v. 15, n. 2, p. 155-161, 2004.

FONTOURA, D. da; COSTA, A. C. T. da; STANGARLIN, J. R.; TSUTSUMI, C. Y. Indução de resistência a doenças em milho de segunda safra por acibenzolar-S-metil e mananoligossacarídeo fosforilado. Ciências Agrárias, Londrina, v. 36, n. 6, p. 3657-3664, nov./dez. 2015.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. Revista Ceres, Viçosa, v. 61, Suplemento, p.819-828, nov/dez, 2014.

GAMARELO, E.; D'AMELIO, R.; MUSSO, C. et al. Effects of *Pseudomonas putida* S1Pf1Rif Against Chrysanthemum Yellows Phytoplasma Infection. Phytopathology, v. 100, n. 8, p. 805-813, July, 2010.

GARCIA, E. O. Resistência de cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à sarna comum (*Streptomyces* spp.) e mecanismo de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo (*Sorghum bicolor*): aspectos bioquímicos e ultraestruturais. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2008.

GARCIA, E. O.; PASCHOLATI, S. F.; CASELA, C. R.; FIALHO, M. B. Fitotoxina taxtomina A (*Streptomyces* spp): efeito *in vitro* e indução de resistência em plantas de sorgo contra *Colletotrichum sublineolum*. In: 41 Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Trop Plant Pathol. 33, p.191-191, 2008b.

GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. Eur J Plant Pathol 121:233-242, 2008.

GOYER, C.; VACHON, J.; BEAULIEU, C. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production, Phytopathology, v. 88, p. 442-445, 1998.

GUNDERSEN, D. E.; LEE, I. M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathology Mediterranea, v. 35, p. 144-151, 1996.

GRANADOS, R.R. Electron microscopy of plants and insect vectores infected with the corn stunt disease agente. Contribution Boyce Thomposon Institute, v. 24, p. 173-187, 1969.

GUTHRIE, J. N.; WALSH, K. B.; SCOTT, P. T.; RASMUSSEN, T. S. The phytopathology of Australian papaya dieback: a proposed role for the phytoplasma. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 58, n. 1, p. 23-30, 2001.

HARTLEB, H.; HEITEFUSS, R.; HOPPE, H. Resistance of crop plants against fungi. Stuttgart: G. Fischer, 544p., 1997.

HAAS, I. C. R. Potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma e o espiroplasma, agentes do enfezamento do milho, e alterações bioquímicas em plantas infectadas pelo espiroplasma. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R. E. (Ed.). Microbes and microbial products as herbicides. American Chemical Society, Washington, p. 87-113, 1990.

HRAZDINA, G. Compartmentation in phenolic metabolismo. Acta Horticulturae, Wageningen, v. 1, n. 381, p. 8693, 1994.

JACQUES, F. L. Efeito de produtos alternativos *in vitro* e em casa de vegetação no controle de *Colletotrichum graminicola*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2015.

JARAUSCH, W.; TORRES, E. Management of phytoplasma-associated diseases. In: Phytoplasmas and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact. Food and Agriculture COST Action FA0807 Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems, p. 199-250, 2014.

JUNQUEIRA, A. C. B. Alterações bioquímicas em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

KATZ, V.A., THULKE, O.U., CONRATH, U. A benzothiadiazole primes parsley cell for augmented elicitation of defense responses. Plant Physiol 117:1333, 1998.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 32, p. 439-459, 1994a.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; LIGON, J.; OOSTENDORP, M.; RYALS, J. Activation of systemic acquired disease resistance in plants. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 100, p. 359-369, 1994b.

KOFALVI, S. A.; NASSUTH, A. Influence of wheat streak mosaic vírus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignina in wheat. Physiol Mol Plant Pathol, v.47, pp. 365-377, 1995.

KOHLER A. SCHWINDLING, S., CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/N1M1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 128:1046-1056, 2002.

KUHN, O. J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

KUMAR, M.; YADAV, V.; TUTEJA, N.; JOHRI, A. K. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology*, New York, v. 155, p. 780-790, 2009.

LABANCA, E. R. G. Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). 2002. 118 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

LEE, I. M.; HAMMOND, R. W.; DAVIS, R. E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 83, p. 834-842, 1993.

LEE, I. M.; GUNDERSEN, D. E.; HAMMOND, R. W.; DAVIS, R. E. Use of mycoplasma-like organismo (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, v.84, p. 559-566, 1994.

LEHERER, R.E. Antifungal effects of peroxidase systems. *Journal Bacteriological*, v.99, p. 361-365, 1969.

LÉON, R.; SANTAMARIA, L.; ALPIZAR, A.; ESCAMILLA.; OROPEZA, C. Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. *New Phytologist*, v. 134, p.227-234, 1996.

LIU J., TIAN, S., MENG, X., XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biol Technol* 44:300-306, 2007.

LINTHORST, H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v. 10, p. 123-150, 1991.

LYGIN, A.V., LI, S., VITAL, R. et al. The importance of phenolic metabolism to limit the growth of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology* 99:1412-1420, 2009.

LORIA, R. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces species in vitro*. *Phytopathology*, v. 85, p. 537.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathol*, v. 25, pp. 244-249, 1999.

MACKINNEY, G. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal Biological Chemistry*. V. 140, p. 315-322, 1941.

MARTINEZ, C.; BACCOU, J. -C.; BRESSON, E.; BAISSAC, Y.; DANIEL, J. -F.; JALLOUL, A.; MONTILLET, J. -L.; GEIGER, J. -P.; ASSIGBETSÉ, K.; NICOLE, M. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 122, p. 757-766, 2000.

MALKIN, R.; NIYOGI, K. Photosynthesis. In: BUCHANAN, B. B., GRISSEM, W., JONES, R.L., eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 568–628, 2000.

MASSOLA JÚNIOR, N.S. Avaliação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido na cultura do milho. 1998. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998b.

MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I.P.; AMORIM, L.; LOPES, J. R. S. Quantificação de danos causados pelo enfezamento pálido do milho em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.136-142, 1999a.

MUSETTI R, BUXA SV, DE MARCO F, LOSCHI A, POLIZZOTTO R, et al. Phytoplasma-triggered Ca^{2+} influx is involved in sieve-tube blockage. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26:379–86, 2013b.

MUSETTI, R.; ERMACORA, P.; MARTINI, M.; LOI, N.; OSLER, R. What can we learn from the phenomenon of “recovery”? *Phytopathogenic Mollicutes* 3 (1), p.63-65, 2013.

MUSETTI, R., FAVALI, M.A., PRESSACO, L. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios*, v. 102, n.401, p. 133-147, 2000./Resumo/

NAULT, L. R. Mayze bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogens host ranges, and vectors. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 70, p. 659-662, 1980.

NACZK, MARIAN; SHAHIDI, FERIDOON. Extraxtion and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111, 2004.

NEUMANN, M. M.; SPADOTTO, D. V.; CRESTANI, N.; SANTOS, F. Da S.; ACUNHA, J. G. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-s-methyl (ASM) associado a fungicidas no controle de doenças foliares em milho (*Zea mays* L.). In: PEREIRA, A. I. A. (eds) *De grão em grão*. Editora Atena, pp 40-47, 2019.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 30, p. 369-389, 1992.

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J.M.; FERNANDES, F.T.; PAIVA, E.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W. “Enfezamento pálido” e “enfezamento vermelho” na cultura do milho no Brasil Central. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 23, p. 45-47, 1998.

OLIVEIRA, C.M.; MOLINA, R.M.S.; ALBRES, R.S.; LOPES, J.R.S. Disseminação de mollicutes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 27, p.91-95, 2002.

OLIVEIRA, C. M. De; SABATO, E. De O. Estratégias de Manejo de *Dalbulus maidis*, para controle de enfezamentos e virose na cultura do milho. In: PAES, M.C.D.; PINHO, R.G.Von; MOREIRA, S.G. (Eds.). Soluções integradas para os sistemas de produção de milho e sorgo no Brasil. Sete Lagoas, MG, p.749-780, 2018.

OLIVEIRA, De E.; FERNANDES, F. T. SOUZA De, I. R. P.; OLIVEIRA De, C. M.; CRUZ, I. Enfezamentos, Virose e Insetos Vetores em Milho - Identificação e Controle. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica 61. Dezembro, 2003.

OLIVEIRA, M. J., CASTRO, S., PALTRINIERI, S., BERTACCINI, A., SOTTOMAYOR, M., SANTOS, C. S., et al. "Flavescence dorée" impacts growth, productivity and ultrastructure of *Vitis vinifera* plants in Portuguese "Vinhos Verdes" region. *Sci. Hortic.* 261, 108742, 2020.

ÖZBECK, E.; MILLER, S.A.; MEULIA, T.; HOGENHOUT, S.A. Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelli* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 82, p. 167-171, 2003.

PAULA DE, S. Taxotomina parcialmente purificada e preparações de *Streptomyces scabies* na indução de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2019.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: Amorin, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. (eds). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos, 5th edn. Editora Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, p.389-419, 2018.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: Amorin, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. (eds). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos, 5th edn. Editora Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, p.424-450, 2018b.

PASCHOLATI, S.F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN, L. (Ed.). Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 3. Ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, 1995. v.1, cap. 22, p. 417-453.

PASCHOLATI, S. F.; De MELO, T. A.; DALIO, R. J. D. Indução de resistência contra patógenos: definição e perspectivas de uso. Visão Agrícola. Versão Eletrônica – USP Esalq ano 9, jul/dez, p.110-112, 2015.

PERDOMO, D. N. Doses de silício na produtividade e na indução de resistência de plantas de milho a *Spodoptera frugiperda* (SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

PEREIRA FILHO, I. A. Sistema de Produção, 1 – Cultivo do Milho. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo. Versão Eletrônica – 9º edição. Novembro, 2015.

REPKA, V., FISCHEROVA, I., SILHAROVA, K. Biological activity of the elicitor released from mycelium of a grapevine isolate of the necrotrophic fungus *Botrytis cinérea*. Vitis, Germany, v. 40, p. 205-212, 2001.

ROMANAZZI, G. Perspectives for the management of phytoplasma diseases through induced resistance: what can we expect from resistance inducers? Phytopathogenic Mollicutes 3 (1), p.60-62, 2013.

ROMANAZZI, G.; D´ASCENZO, D.; MUROLO, S. Field treatment with resistance inducers for the control of grapevine Bois noir. Journal of Plant Pathology, v. 91, n. 3, p. 677-682, October, 2009.

ROMANAZZI, G.; MUROLO, S.; FELIZIANI, E. Effects of an Innovative Strategy to Contain Grapevine Bois Noir: Field Treatment with Resistance Inducers. Phytopathology, v. 103, n. 8, p. 785-791, March, 2013b.

SANTI, S., DE MARCO, F., POLIZZOTTO, R., GRISAN, S., AND MUSETTI, R. Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. Front Plant Sci. 4:171, 2013.

SHAHIDI F, NACZK M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic; 1995.

SUDHAMOY, M. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. African J Biotechnol 9:8038-8047, 2010.

SOUZA, G. M.; BARBOSA, A. M. Fatores de estresse no milho são diversos e exigem monitoramento constante. Visão Agrícola n° 13. Versão eletrônica, p. 30-34, jul/dez, 2015.

SOLOGUREN, LEONARDO. Demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir produção. Visão Agrícola n° 13. Versão eletrônica, p. 8-11, jul/dez, 2015.

SPLETZER, M.E.; ENYEDI, A.J. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. Phytopathology 89:722–727, 1999.

TOFFANELLI, C.M. Efeito do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e da população de vetores infectivos sobre sintomas e componentes de produção. 2001. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

VANCE, C.P., KIRK, T.K., SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. Annu Rev Phytopathol 18: 259-228, 1980.

VIECELLI, CLAIR. A. *et al.* Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. Tropical Plant Pathology, 34 (2), March – April, 2009.

VITALI, M.; CHITARRA, W.; GALETTO, D. L.; BOSCO, C.; MARZACHÌ, M. L.; GULLINO, F.; SPANNA, C.; LOVISOLO. “Flavescence dorée” phytoplasma deregulates stomatal control of photosynthesis in *Vitis vinífera* Ann. Appl. Biol., 162, pp. 335-346, 2013.T

WAQUIL, J. M. Cigarrinha-do-milho: vetor de mollicutes e vírus. Sete Lagoas: Entomologia Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica 41. Junho, 2004.

WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A.; CRUZ, I.; SANTOS, J.P. Aspectos da biologia da cigarrinha-do milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: cicadellidae). Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE), 1999.

WEI, W.; KAKIZAVA, S.; SUZUKI, S.; JUNG, H.-Y.; NISHIGAWA, H.; MIYATA, S.; OSHIMA, K.; UGAKI, M.; HIBI, T.; NAMBA, S. In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology* 94: 244-250, 2004.

ZAMHARIR, M. G.; TAHERI, M. Effect of new resistance inducers on grapevine phytoplasma disease. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v. 52, n. 4, p. 1-8, December, 2019.

ZÚÑIGA-SILVESTRE, C. A., DE-LEÓN-GARCÍA-DE-ALBA, CARLOS, AYALA-ESCOBAR; VICTORIA, VÍCTOR A. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ. Induced resistance to common rust (*Puccinia sorghi*), in maize (*Zea mays*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 32(1): 11-18, 2020.