Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Haas, Isolda Cristina Ruschel
Potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma e o espiroplasma, agentes do enfezamento do milho, e alterações bioquímicas em plantas infectadas pelo espiroplasma / Isolda Cristina Ruschel Haas. - - Piracicaba, 2010.
73 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bioquímica vegetal 2. Cigarrinhas 3. Enfezamento (Doença de planta) 4. Fitoplasmas Milho 6. Mollicutes 7. Plantas hospedeiras 8. Vetores de doenças de plantas I. Título

CDD 633.15
H112p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

2.1.2.2.1 Enfezamento pálido

Os primeiros sintomas típicos da infecção causada pelo espiroplasma se traduzem pelo aparecimento de clorose marginal nas folhas e desenvolvimento de pequenas manchas cloróticas na base da lâmina foliar (NAULT, 1980). Posteriormente, à medida que a planta emite novas folhas, listras e áreas cloróticas passam a tomar grandes porções do limbo foliar, contrastando com a cor verde. Em climas mais amenos, as manchas e listras cloróticas podem não ocorrer, observando-se apenas um amarelecimento das folhas superiores.

Além desses sintomas característicos, plantas infectadas por *S. kunkelii* podem apresentar encurtamento de internódios, crescimento reduzido, colmos finos, aparecimento de perfilhos na base do colmo ou nas axilas foliares (TSAI; MILLER, 1995; SILVA et al., 2002). Pode ser observada também proliferação de espigas mal formadas, com granação escassa e enchimento incompleto de grãos, sendo que estes podem se apresentar manchados, pequenos e frouxos na espiga (OLIVEIRA et al., 2003).

Figura 1 - Sintomas do enfezamento pálido observado em plantas de milho c.v. Zélia. As plantas exibem encurtamento de entrenós (enfezamento) e listras cloróticas na lâmina foliar

2.1.2.2.2 Enfezamento vermelho

O sintoma inicial presente em plantas infectadas com o fitoplasma é a clorose marginal das folhas, seguida de um avermelhamento da região apical das folhas mais velhas (NAULT,

1980). Com o tempo, esse avermelhamento pode evoluir para o restante do limbo foliar. As folhas podem aparecer retorcidas e com os bordos rasgados (BEDENDO, 1995). Assim como ocorre no enfezamento pálido, as plantas mostram crescimento reduzido, resultante do encurtamento dos internódios, gerando um aspecto raquítico. Também pode ocorrer proliferação de espigas mal formadas e presença de perfilhamento excessivo na base e até mesmo nas axilas foliares (TOFFANELLI, 2001; TSAI; FALK, 1988). Além disso, é importante ressaltar que algumas plantas infectadas podem não exibir sintomas externos (LEE; DAVIS; GUNDERESEN-RINDAL, 2000).

Figura 2 - Sintomas do enfezamento vermelho em plantas de milho da c.v. Zélia. As plantas exibem encurtamento de entrenós (enfezamento) e as folhas apresentam clorose marginal avermelhamento do limbo

2.1.2.3 Diagnose

No início dos estudos das doenças associadas aos molicutes, a diagnose era baseada na expressão de sintomas pela planta doente, complementada por alguns testes biológicos, como a determinação da gama de hospedeiros e de insetos vetores das doenças (DAVIS, 1995). A microscopia eletrônica muito contribuiu para a diagnose deste tipo de doença, principalmente no caso dos fitoplasmas, evidenciando a presença dos mesmos nos tecidos de plantas suspeitas de infecção. Os espiroplasmas, por sua vez, foram por algum tempo detectados na seiva de plantas doentes e hemolinfa de insetos vetores através de microscopia de campo escuro ou de contraste de fase (DAVIS; WORLEY, 1973). Na década de 80, com o desenvolvimento das técnicas

moleculares envolvendo a amplificação de fragmentos genômicos (como exemplo a técnica de Polymerase Chain Reaction - PCR) e o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e policlonais (teste de enzyme linked immunosorbent assay - ELISA,), ocorreram grandes avanços no estudo destes molicutes e na diagnose de doenças associadas aos mesmos. Atualmente, além da detecção pela PCR, a identificação de fitoplasmas e sua classificação em grupos têm sido feita com o emprego de técnicas moleculares, destacando-se análise de RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism) e a PCR com o uso de primers específicos (LEE et al., 1998). Os fitoplasmas estão ordenados em 17 grupos e mais de 40 subgrupos e o agente do enfezamento vermelho do milho está classificado como pertencente ao grupo 16SrI, subgrupo B (LEE et al., 2004). Além disso, o sequenciamento do 16S rDNA permite estabelecer níveis de diversidade genética entre os fitoplasmas e suas relações filogenéticas com outros procariotos (BERTACCINI, 2007; NERONI, 2009).

2.1.2.4 Transmissão

No Brasil, o vetor dos agentes do complexo do enfezamento do milho é a cigarrinha *Dalbulus maidis* (DeLONG E WOLCOTT, 1923), pertencente à ordem Hemiptera, família Cicadellidae, subfamília Deltocephalinae e tribo Marcostelini. Este inseto tem coloração amarelo-palha, com cerca de 3,7 a 4,3 cm de comprimento. Os adultos apresentam duas manchas circulares negras na coroa, o que permite diferenciá-lo de outras espécies de cigarrinhas comumente encontradas na cultura do milho (TRIPLEHORN; NAULT, 1985; OLIVEIRA, 2000). No México, local de origem do milho e de *D. maidis*, são conhecidas outras 12 espécies desse gênero (NAULT; DeLONG, 1980), algumas igualmente capazes de transmitir estes patógenos (NAULT, 1980).

Experimentalmente, outras espécies desse gênero se mostraram vetoras dos molicutes e do vírus associados ao enfezamento, entre elas *D. tripsacoides*, *D. gelbus*, *D. guevarai*, *D. quinquenotatus*, *D. tripsaci* (MADDEN; NAULT, 1983). Outros gêneros também já foram descritos como transmissores sob condições experimentais, como *Graminella nigrifrons* para o fitoplasma, e *G. nigrifrons*, *Stirellus bicolor*, *Euscelidius variegatus* e *Exitianus exitiosus* para o espiroplasma (NAULT, 1980; ALIVIZATO, 1984). Investigações mostraram que *D. maidis* é um vetor muito mais eficiente quando comparado com *G. nigrifrons*.

A relação entre estes molicutes e seu vetor é do tipo persistente propagativa (NAULT, 1980), não tendo sido constatada a transmissão dos patógenos por via transovariana. Segundo Massola Júnior (2001), este tipo de associação é caracterizada por períodos bastante definidos, envolvendo aquisição, latência ou incubação, inoculação e retenção.

O período de acesso à aquisição (PAA) é o tempo necessário para que o inseto se alimente da planta fonte infectada e adquira o patógeno. Já o período de acesso à latência (PAL) é a fase em que inseto se torna apto a transmitir o patógeno e compreende o tempo no qual o patógeno circula pelo corpo do vetor e chega até as glândulas salivares, de onde é transmitido através do canal salivar durante a alimentação do inseto na planta. O período de acesso à inoculação (PAI) é definido como tempo necessário para que o inseto vetor infectivo entre em contato com uma planta sadia e transmita, através da salivação, o molicute para este novo hospedeiro. E, para finalizar, o período de retenção abrange o tempo que o inseto se encontra apto a transmitir o patógeno, sendo o seu início marcado pelo início da transmissão.

O período médio para uma efetiva aquisição do espiroplasma e do fitoplasma por *D. maidis* é de 3 dias (LEGRAND; POWER, 1994). A latência varia de 17 a 23 dias para *D. maidis*-espiroplama e de 22 a 28 dias para *D. maidis*-fitoplasma (NAULT, 1980). A inoculação, para ambos os casos, ocorre entre 3 e 9 dias (LEGRAND; POWER, 1994), enquanto a retenção é bastante longa, podendo variar de semanas até toda vida útil do inseto.

Outro fator que interfere na aquisição do fitoplasma por *D. maidis* é a prévia aquisição de espiroplasma pelo inseto vetor. O desenvolvimento do fitoplasma pode ser reduzido por uma competição com o espiroplasma (OLIVEIRA et al., 2007). A temperatura também pode alterar o período de aquisição, pois, aparentemente, o fitoplasma necessita temperaturas mais altas para se desenvolver que o espiroplasma. Além do patógeno, o inseto vetor também é afetado sensivelmente pela temperatura, sendo que em temperaturas abaixo de 20ºC não ocorre eclosão de ninfas, embora seus ovos permaneçam viáveis.

2.1.2.5 Controle

2.1.2.5.1 Controle genético

Sem dúvida, o emprego de genótipos com alta resistência genética se constitui numa das alternativas mais eficientes e recomendadas no controle dos enfezamentos (SILVA et al., 2003; SHURTLEFF, 1980). Sua grande vantagem é a relação custo-benefício do controle, bem como a

grande probabilidade de sucesso. Infelizmente, nem todas as variedades ou híbridos disponíveis no mercado possuem resistência satisfatória.

2.1.2.5.2 Controle químico do inseto vetor

Além do controle genético, uma das alternativas mais exploradas no controle de *D. maidis* é o uso de inseticidas nos estádios iniciais do desenvolvimento do milho. Os produtos registrados no Ministério da Agricultura para esse fim são o imidacloprid, thiamethoxan e a clotianidina. Entretanto, segundo Oliveira et al. (2007), o tratamento de sementes com imidacloprid e thiamethoxan não assegura a redução dos enfezamentos no campo, apenas em viveiro telado. Além disso, os autores citam o tratamento com imidacloprid como mais eficiente quando feito através de tratamento de sementes. Além da recomendação de um tratamento de sementes, que protege as plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento, período em que estão mais suscetíveis à doença e ao aparecimento de sintomas, indica-se uma nova aplicação do inseticida 30 dias após a germinação. A principal desvantagem do método químico de controle é a ineficácia instantânea dos inseticidas, levando em conta a grande mobilidade do inseto vetor (TOFFANELLI, 2001).

2.1.2.5.3 Outros métodos de controle

Em primeiro lugar, deve-se evitar o cultivo de milho em áreas severamente atacadas pela doença e pelo inseto vetor. Segundo Bianchini (2001) também é importante evitar o plantio de milho tardio (segunda safra), pois a semeadura é realizada nos meses de janeiro/março, enquanto que o pico populacional da cigarrinha-do-milho é março/abril, período em que o milho está nos estádios iniciais do seu desenvolvimento, mais suscetível à doença e ao aparecimento de sintomas.

Outra medida recomendada é a rotação de cultura, que evita o cultivo de milho (hospedeiro preferencial do vetor) durante o ano inteiro. Além disso, podem ser utilizadas culturas intercalares, visando diminuir a mobilidade de *D. maidis* no campo e a consequente disseminação dos patógenos veiculados pela cigarrinha.

A utilização balanceada de nitrogênio, aliada a uma adequada densidade de plantio, garante plantas mais vigorosas, cujos sintomas são amenizados e a produtividade não é afetada de forma tão significativa.

2.1.2.6 Hospedeiros alternativos

2.1.2.6.1 Plantas hospedeiras do espiroplasma

Na literatura (TSAI; FALK, 1988) além do milho (*Zea mays*) são citadas como plantas hospedeiras do espiroplasma as espécies botânicas *Z. mays mexicana*, *Z. luxuarians*, *Z. perennis*, *Z. diploperenis*, tripsacum (*Tripsacum dactiloides* e *T. floridanum*) e teosinto (*Euchlaena mexicana*).

Nos Estados Unidos, o agente do enfezamento pálido já foi isolado de plantas sintomáticas de sorgo. Após a realização de testes experimentais, concluiu-se que o vetor desta doença era *G. nigrifrons*, enquanto que *D. maidis* não foi capaz de transmitir o espiroplasma (ROSENKRANZ, 1970). A fava (*Vicia faba*), a vinca (*Catharanthus roseus*), o rabanete (*Raphanus sativus*), a mostarda-branca (*Sinapis alba*) e o espinafre (*Spinacia oleracea*) também foram relatadas como plantas hospedeiras do patógeno (TSAI; FALK, 1988; ALIVIZATO, 1984).

2.1.2.6.2 Plantas hospedeiras do fitoplasma

Para o fitoplasma do enfezamento vermelho, além do milho, apenas outras três espécies dentro do gênero *Zea* são relatadas como hospedeiras. Entretanto, Whitcomb (1989) levanta a hipótese de que pode haver outros hospedeiros alternativos na natureza, pois o patógeno sobrevive entre as estações de cultivo.

Recentemente, um trabalho sobre o assunto revelou que algumas espécies de gramíneas poderiam atuar como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do enfezamento do milho (HAAS, 2006). Esta possibilidade foi evidenciada pela transmissão experimental do agente para os capins braquiária (*Brachiaria decumbens*), colonião (*Panicum maximum*) e marmelada *Brachiaria plantaginea*, através de cigarrinhas *D. maidis* alimentadas em plantas de milho infectadas com o fitoplasma. No entanto, para comprovação desta evidência haveria a necessidade de se demonstrar o processo inverso, ou seja, a passagem do patógeno a partir dos capins para as plantas de milho.

Ainda como exemplo dentro de gramíneas, o fitoplasma agente da folha branca da cana-de-açúcar foi relatado como tendo por possíveis hospedeiros alternativos as espécies *Cenchrus setiger*, *Cenchrus ciliaris*, *Eriachne obtusa* e *Eragrostis falcata* (TRAN-NGUYEN et al., 2000).

No Brasil, várias espécies de plantas silvestres e daninhas também já foram relatadas como hospedeiras de fitoplasmas diversos, entre elas picão preto (*Bidens pilosa*), sempre-viva (*Helychrisia bracteatum*), guanxuma (*Sida rhombifolia*), fedegoso (*Senna obtusifolia*), melão de São Caetano (*Momordica charanta*), crotalária (*Crotalaria juncea* e *C. paulinea*), margaridinha (*Crysanthemum parthenium*), arnica-do-campo (*Solidago microglossa*), espinafre da Nova Zelândia (*Tetragonia expansa*), douradinho do campo (*Waltheria indica*), catinga-de-bode (*Ageratum conyzoide* e *A .fastigiatum*), mimo-de-vênus (*Hibiscus rosa sinensis*) e crista-de-galo (*Celosia* sp.) (KITAJIMA, 1994).

2.1.2.6.3 Plantas hospedeiras do vetor

O hospedeiro primário da cigarrinha *D. maidis* é o milho. No entanto, espécies do gênero *Tripsacum* (*T. dactiloides* e *T. pilosum*), teosinto (*Euchlaena mexicana*) e outras do gênero *Zea*, como *Z. perennis*, *Z. diploperennis* e *Z. luxurians* (TSAI, 1988) também são citadas como plantas hospedeiras presentes no México e em outros países da América Latina. Waquil et al. (1999) observaram a presença de insetos adultos e ovos de *D. maidis* em plantas de sorgo, alertando para a necessidade de mais estudos que explicassem estas observações feitas em campo.

Para Moya-Raygoza et al. (2007), algumas cigarrinhas aparentemente podem se alimentar de gramíneas que crescem como plantas daninhas na bordadura do milho e os autores alertam para o fato de que não há estudo investigando se a cigarrinha-do-milho pode sobreviver à entressafra se alimentando dessas plantas. Segundo Oliveira (2000), no Brasil também há relatos da presença de cigarrinhas-do-milho em plantas de batata, algodão e algumas gramíneas; no entanto, este autor considera como acidentais as coletas destes insetos nos referidos cultivos.

2.1.2.7 Alterações bioquímicas causadas por molicutes em plantas doentes

Após a transmissão pelo vetor, os molicutes passam a colonizar o tecido do hospedeiro a partir do ponto de infecção. Para a captação de nutrientes, estes patógenos podem causar alterações no metabolismo da planta. Concomitantemente, a planta também reage, formando barreiras físicas e produzindo substâncias químicas de defesa (PASCHOLATI, 1995). Esta batalha entre os molicutes e a planta de milho, tanto ao nível fisiológico como bioquímico, ainda é pouco conhecida e o seu estudo poderá contribuir para o entendimento do mecanismo envolvido na interação hospedeiro-patógeno. Este tipo de informação talvez possa ser útil para a

adoção de estratégias para um manejo mais eficiente, com o objetivo de minimizar os danos causados pelas doenças.

Poucos são os estudos desta natureza encontrados para o patossistema milho-espiroplasma. Souza et al. (2003) avaliaram a atividade do ácido ferúlico e 5,5'-di-ferúlico, teor de proteínas solúveis e a atividade da enzima peroxidase para híbridos de milho resistentes e suscetíveis ao enfezamento pálido. Os resultados demonstraram que as plantas resistentes, no estádio de plântula, apresentaram maior teor de proteínas solúveis e menores valores de atividade específica da peroxidase. Para o ácido ferúlico e 5,5'-di-ferúlico não houve resultados significativos entre a correlação fenotípica e os teores dos respectivos ácidos.

Para o enfezamento vermelho, Junqueira (2003) avaliou alterações de proteínas, fenóis, clorofilas, açúcares redutores e das enzimas peroxidase, -1,3 glucanase e quitinase em híbridos de milho resistentes e suscetíveis ao fitoplasma. A autora observou que, em geral, houve um aumento de todos os parâmetros avaliados nas plantas inoculadas com o fitoplasma, quando comparadas àquelas que não foram inoculadas (testemunhas). O aumento nas concentrações de proteínas, açúcares redutores e fenóis foram atribuídos às alterações nos processos metabólicos do hospedeiro, em decorrência da infecção pelo patógeno, enquanto que as alterações enzimáticas foram interpretadas como respostas inespecíficas de defesa da planta.

Na década de setenta, Schneider (1977), estudando o declínio da pereira causado por um fitoplasma, sugeriu que metabólitos tóxicos provenientes da interação hospedeiro-patógeno eram translocados dos vasos mais novos para os mais velhos, resultando na aparente perda de funcionalidade do floema. León et al. (1996), trabalhando com plantas de coqueiro infectadas pelo fitoplasma do amarelecimento foliar, observaram alterações na condutância estomatal, as quais poderiam estar afetando a troca gasosa e alguns processos relacionados, como o movimento hídrico e a fotossíntese. Com base nos resultados desta pesquisa, os autores propuseram que a indução do fechamento dos estômatos pela ação do fitoplasma era responsável pelos sintomas observados e, portanto, um dos mecanismos de patogenicidade. Além disso, foi constatada a redução da taxa fotossintética e da quantidade de proteínas, carotenóides e clorofila, levando à conclusão de que o amarelecimento foliar do coqueiro é um fator do processo de senescência da planta. É importante ressaltar que estes autores evidenciaram a ocorrência de alterações hormonais nas plantas, avaliadas através de um aumento na quantidade de ácido abscísico e na capacidade do tecido em formar etileno. Maust et al. (2003), trabalhando com o mesmo

patossistema, observaram alteração na condução estomática, na fotossíntese, e na respiração das raízes em coqueiros infectadas com o fitoplasma. Demonstraram também uma diminuição na concentração de carboidratos e na taxa de fotossíntese da planta, porém este decréscimo de carboidrato não foi encontrado nas folhas, onde, ao contrário, houve um aumento de sua concentração. Estes resultados sugeriram uma inibição no transporte de açúcares pelo floema, ocasionando o estresse dos tecidos e o aparecimento de sintomas externos.

Bertamini e Nedunchezhian (2001), estudando o patossistema videira e o agente do amarelo ("Bois Noir"), verificaram em plantas doentes um decréscimo no conteúdo de clorofila, carotenóide, proteínas solúveis e na atividade de ribulose-1,5-bisphosphate (Rubisco) e nitrato e nitrito redutases em folhas; por outro lado, demonstraram que houve um aumento no conteúdo de açúcares solúveis e acúcares totais.

Na cana de açúcar, Fontaniella et al. (2003) e Piñon et al. (2009) observaram algumas mudanças ultra-estruturais em plantas exibindo sintomas da síndrome do amarelecimento foliar. A epiderme abaxial de folhas doentes apresentou uma grande quantidade de "corpos" aderidos à superfície, obstruindo a abertura de estômatos. Também foram observados aumento da concentração de açúcares redutores, índice de glicose e uma diminuição de sacarose, além de um aumento de arginase e ornitina, que são responsáveis pela síntese de poliaminas.

2.2 Material e Métodos

Espiroplasma

2.2.1 Avaliação de possíveis hospedeiros para o espiroplasma

2.2.1.1 Espécies de plantas

As seguintes espécies de gramíneas, entre elas alguns capins comumente empregados na formação de pastagens, foram avaliadas como possíveis hospedeiras para o espiroplasma, agente do enfezamento pálido, e o seu vetor, a cigarrinha *D. maidis*: *Panicum maximum* (capim colonião), *Brachiaria decumbens* (braquiária), *Brachiaria plantaginea* (capim marmelada) *Shorgum bicolor* (sorgo), *Pennisetum americanum* (milheto) e *Pennisetum purpureum* (capim elefante).

Entre as ervas daninhas que ocorrem frequentemente na cultura do milho, foram testadas: *Cenchrus echinatus* (capim carrapicho), *Melinis minutiflora* (capim gordura), *Portulaca oleracea*

(beldroega), *Rottboelia exaltata* (capim camelote), *Digitaria insularis* (capim amargoso) e *Sorghum halepense* (capim massambará).

Sementes de todas as espécies listadas acima foram pré-germinadas em papel de filtro umedecido, para obtenção de uniformidade no desenvolvimento das plantas, e após sua germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos de 1,5 L de capacidade, contendo como substrato uma mistura de solo, areia e matéria orgânica.

2.2.1.2 Obtenção da população sadia e infectiva do vetor

O fato da cigarrinha-do-milho não transmitir o molicute por via transovariana foi decisivo na escolha da metodologia para a obtenção de uma colônia de insetos sadia. Cigarrinhas-do-milho (*D. maidis*) foram coletadas em lavoura de milho infestada com o auxílio de um aspirador e confinadas em plantas sadias por quatro dias. Esse confinamento foi realizado com o auxílio de pequenas gaiolas que ficaram presas às folhas das plantas, determinando o local da postura e facilitando a excisão dos ovos (Figura 3).

Após esse período, as cigarrinhas e as "gaiolinhas" foram removidas e as plantas mantidas em BOD ajustada com temperatura média de 26°C e período de 12 horas de luz/escuro por mais cinco dias. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico e agulha histológica, os ovos foram retirados da superfície foliar delimitada e depositados em placas de Petri de vidro, que continham em seu interior papel de filtro umedecido em água destilada. Estes ovos foram mantidos em BOD regulada para fornecer as mesmas condições de temperatura e luminosidade já referidas anteriormente. As ninfas começaram a eclodir cerca de dois ou três dias após a excisão, e aquelas de primeiro ínstar foram transferidas para plantas de milho mantidas em gaiolas de criação.

Para se obter a população infectiva do vetor, ninfas de segundo e terceiro ínstares da colônia sadia foram transferidas para plantas de milho infectadas com o espiroplasma do enfezamento pálido do milho (plantas-fonte). O período de acesso à aquisição (PAA) do espiroplasma foi de quatro dias, sendo as ninfas posteriormente transferidas para plantas sadias de milho, nas quais permaneceram por aproximadamente vinte e dois dias, correspondentes ao período de latência (PAL).

2.2.1.3 Inoculação experimental das plantas com o espiroplasma

No estádio de 3 a 4 folhas, aproximadamente 20-30 dias após o do plantio das sementes, 10 plantas de cada uma das espécies testadas foram inoculadas com o espiroplasma. Para isso, confinou-se 10 cigarrinhas infectivas/planta, durante 4 dias, através de gaiolas feitas de garrafas plásticas de 2 L (Figura 3).

Como controle positivo para avaliação da transmissão do agente causal da doença, 10 plantas de milho pipoca cv. Zélia, suscetíveis ao espiroplasma, foram inoculadas com indivíduos da mesma população infectiva de cigarrinhas. Após o confinamento, todas as plantas foram mantidas em casa telada e pulverizadas com inseticida piretróide lambda-cialotrina, visando eliminar o vetor e, futuramente, a eclosão de seus ovos. Cinco plantas das diferentes espécies testadas foram expostas a cigarrinhas sadias e consideradas como testemunhas (controle negativo).

As avaliações foram feitas através do aparecimento ou não de sintomas ao longo do ensaio, que teve duração média de 60 dias. Ao seu término, coletaram-se amostras de tecido foliar que foram submetidas ao teste de PCR, visando demonstrar a presença ou ausência do espiroplasma nas plantas, independentemente de terem sido ou não inoculadas com o patógeno.

Figura 3 – A - Gaiolas usadas para criação dos insetos, B - Gaiolas feitas de garrafas de 2 L e usadas na inoculação dos insetos e C - “Gaiolinhas” utilizadas no confinamento de insetos

2.2.1.4.1 Extração de DNA total

Para a extração do DNA total das amostras foram empregadas duas metodologias: extração rápida (DOYLE ; DOYLE, 1987) e extração com o kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (GREEN; THOMPSON; McKENZIE, 1999).

2.2.1.4.1.1 Extração rápida de DNA

O DNA total das plantas foi extraído a partir de amostras foliares. O DNA obtido de plantas de milho sabidamente infectadas pelo espiroplasma serviu como padrão positivo para o teste de PCR.

Cada amostra foi constituída de 2 g de tecido vegetal fresco. Este material foi macerado em almofariz usando-se nitrogênio líquido e, em seguida, transferido para tubos de microcentrífuga com capacidade de 1,5 mL, onde foram adicionados 800 mL de tampão de extração (2 g CTAB, 8,18 g NaCl, 0,74 g EDTA, 1,5 g Tris HCL, 100 mL de água, pH 8,0). Após agitação vigorosa, as amostras foram levadas para incubação à temperatura de 65°C por 30-60 minutos. Durante a incubação, os tubos foram agitados a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão e depois adicionados 600 mL de CIA (24 partes de clorofórmio para 1 parte de álcool isoamílico). A mistura foi novamente agitada vigorosamente até se tornar uma emulsão homogênea. O material foi centrifugado em microcentrífuga a 14.000 rpm durante 10 minutos. Os tubos foram retirados da centrífuga cuidadosamente, evitando-se perturbar a interface entre as duas fases obtidas. A fase superior (aquosa) foi removida com micropipeta e transferida para um novo tubo, onde foi adicionado cuidadosamente igual volume de isopropanol gelado (-20°C), para precipitar o ácido nucléico. O material foi levado a –20°C por um mínimo de 2 horas e uma nova centrifugação foi realizada a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, permanecendo o precipitado no fundo do tubo, que foi lavado com etanol 80% por duas vezes, adicionando-se 1 mL de etanol durante 10 minutos. Após a lavagem, o etanol foi descartado e acrescentou-se 500 µL de NaCl 1M ao precipitado. Em seguida, procedeu-se à incubação por 30 a 60 minutos a 4ºC. Mais uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi realizada. Nesta etapa, o sobrenadante foi removido para um novo tubo e adicionado 350 µL de isopropanol gelado. Os tubos contendo isopropanol foram mantidos durante 2 horas a -20ºC e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. O isopropanol foi removido e foi realizada uma nova lavagem do

precipitado com etanol 80%. Para finalizar, o etanol foi retirado e o precipitado foi deixado para secar à temperatura ambiente e, então, ressuspendido em 50 mL de água deionizada (‘Milli-Q’).

2.2.1.4.1.2 Extração com kit comercial

Para a extração do DNA total usando o kit comercial DNeasy® Plant Mini kit (Qiagen) foram seguidas as recomendações do fabricante.

Aproximadamente 1 g de material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. O material macerado foi transferido para microtubo de 1,5 mL (até atingir pouco menos da metade do microtubo) e adicionados 400 µL do tampão AP1 (Qiagen) e 4 µl de RNAse. Os tubos foram incubados a temperatura de 65^{o}C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 130 µL do tampão AP2 (Qiagen) e os tubos mantidos a -20^{o}C por 5 minutos. A mistura foi aplicada em uma coluna montada sobre tubo coletor e centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi recolhido em um novo microtubo e foram adicionados 675 µL do tampão AP3 (Qiagen). Uma alíquota de 650 µL dessa mistura foi aplicada em outra coluna, a qual foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. O líquido que passou pela coluna foi descartado e a coluna contendo o DNA foi transferida para um novo microtubo. No centro da coluna foram adicionados 500 µL do tampão AW (Qiagen) e foi feita uma centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos, para lavagem do DNA. A coluna foi transferida para um novo microtubo para eluição do DNA com 100 µL de tampão AE (Qiagen). O DNA extraído foi armazenado a -20^{o}C.

2.2.1.4.2 Condições de PCR

O DNA obtido de cada amostra foi diluído em água deionizada (‘Milli-Q’) nas proporções de 1:5 v/v e 1:50 v/v. As reações de PCR foram conduzidas em volume final de 25 mL, contendo 18,35 mL de água, 2,1 mL de tampão 10X PCR, 2 mL de uma mistura de deoxinucleotídio trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo) mais 0,17 mL de enzima Amplitaq (5U/mL). Para amplificação do fragmento correspondente ao 16S rDNA do espiroplasma usou-se os iniciadores CSSF1/R1 (BARROS et al. 2001).

O controle positivo foi representado pelo DNA extraído de planta de milho infectada pelo patógeno e como controles negativos foram utilizados a água e o DNA de plantas inoculadas com insetos sadios.

As reações de PCR foram processadas em um aparelho termociclador (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT), com programa estabelecido de 35 ciclos, cada um compreendendo 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) (BARROS et al., 2001).

As seqüências de iniciadores utilizados encontram-se descritas abaixo:

CSSF1 - 5’ CTGTAGCGGCAAAAGATGTA 3’

CSSR1 - 5’ AGTAGTTGCGGCTGAATAGTT 3’

2.2.1.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e tampão TAE 1X (48,45 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 90 minutos. A coloração do gel foi feita através da adição do produto Sybr safe ® 1% (Invitrogen) ao gel de agarose. A visualização das bandas, correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados, foi feita em um aparelho transluminador de luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado no gel de agarose foi 1 Kb ladder (Life Technologies).

.

2.2.1.5 Sobrevivência da cigarrinha nas espécies de forrageiras e ervas daninhas

A sobrevivência dos insetos nas onze espécies vegetais estudadas foi avaliada 24, 48, 72 e 96 horas após o confinamento, através da contagem do número de indivíduos vivos nas plantas de cada espécie. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa ESTAT.

2.2.2 Alterações bioquímicas em plantas de milho causadas pelo espiroplasma do enfezamento pálido

O ensaio foi conduzido com os híbridos 2B619 da DowAgroscience (considerado resistente ao espiroplasma) e 2A120 da DowAgoscience (suscetível ao espiroplasma). As sementes de milho foram germinadas como descrito no item 2.2.1.1.

A inoculação foi realizada no estádio de 3 a 4 folhas (10 dias após o plantio das sementes) conforme o item 2.2.1.3. Para isto, 10 plantas de híbrido resistente e 10 plantas do híbrido suscetível foram inoculadas através do confinamento de 10 cigarrinhas infectivas/planta. Como

testemunhas foram utilizadas 10 plantas de cada um dos híbridos inoculadas com 10 insetos sadios/planta. O inseticida piretróide lambda-cialotrina foi aplicado imediatamente após a retirada dos insetos e novas aplicações foram realizadas de 10 em 10 dias até o final do experimento.

Durante a coleta do material para realização dos testes bioquímicos, as 10 plantas utilizadas em cada tratamento foram agrupadas 2 a 2, resultando em 5 amostras para cada híbrido por tratamento. As amostragens foram realizadas em 6 períodos: no momento da inoculação (0 dias) e aos 10, 20, 40, 60, e 80 dias após a inoculação (d.a.i). Em cada um destes períodos foram coletadas amostras individualizadas de cada uma das 10 plantas inoculadas e não inoculadas com espiroplasma para fins de detecção do patógeno. A extração de DNA (do tipo rápida) e as condições de PCR seguiram aquelas descritas no item 2.2.1.4.

2.2.2.1 Obtenção e armazenamento das amostras de tecido foliar

Para a realização das análises, foram coletadas 0,5 g do material foliar localizado no terço apical das plantas de milho. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80ºC). Apenas a determinação da clorofila total foi realizada no ato de cada amostragem.

2.2.2.2 Proteína Total

Para a dosagem de proteínas totais foram utilizados 0,5 g de tecido foliar (fresco). Este material foi macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, ao qual foram adicionados 4 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0). A suspensão obtida foi transferida para tubos e centrifugada a 20.000 g durante 25 minutos a 4^{o} C. O sobrenadante foi retirado e transferido para microtubos de 2 mL a fim de determinar a quantidade total de proteínas e realizar outras análises descritas a seguir. Para a determinação das proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976), com a albumina de soro bovino (ASB) como padrão. Neste processo, foi utilizado 40 µL de amostra extraída, adicionados de água deionizada até completar 800 µL e mais 200 µL do reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Após a mistura, aguardou-se 10 minutos e a leitura foi feita em espectofotômetro a 595 nm contra branco apropriado. Os resultados foram expressos em mg de proteína/g de tecido fresco.

2.2.2.3 Clorofila Total

Para análise da clorofila total foi coletado 0,1 g de tecido fresco de folhas. O material foi macerado em almofariz na presença de 20 mL de acetona 80% (v/v), homogeneizado e filtrado em papel filtro Whatman número 1. Determinou-se em espectofotômetro a absorbância das amostras, a 663 nm para determinação de clorofila A e 645 nm para a clorofila B. O conteúdo de cada amostra foi expresso em mg de clorofila/ grama de tecido fresco (ARNON, 1949; HAMMERSCHMIDT; NICHOLSON, 1977).

2.2.2.4 Fenóis Totais

Amostras de 0,5 g de tecido vegetal, coletadas como descrito no item 2.2.2.1, foram maceradas em nitrogênio líquido e levadas para secar durante 6 horas em liofilizador (Integrated SpeedVac System, modelo ISS100, marca Savant). Do material liofilizado, 30 mg foram transferidos para um microtubo de 2 mL, onde se adicionou 1,5 mL de metanol 80%. A suspensão foi homogeneizada e submetida a um agitador rotativo por 15 horas, protegido da luz e mantido à temperatura ambiente. Obteve-se um extrato metanólico que foi centrifugado a 12.000 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Para a determinação dos compostos fenólicos totais, pipetou-se 150 mL deste extrato e adicionou-se 150 mL do reagente Folin-Ciocalteau 0,25N. Esta reação foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo então adicionado 1 mL de água deionizada e mantido por mais 1 hora em temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 725 nm e os valores calculados com base na curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente mg de catecol/g de tecido fresco (RODRIGUES et al., 2005; KUHN, 2007).

2.2.2.5 Açúcares Totais

Na quantificação de carboidratos foi utilizado o método do fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), empregando-se a glicose como padrão. Para isto, em um tubo de vidro, juntou-se 0,5 mL de cada amostra (extraída conforme o item 2.2.2.2) e 0,5 ml de fenol 5%. Rapidamente, para completar a reação, acrescentou-se 2,5 mL de ácido sulfúrico. Este material foi homogeneizado e mantido à temperatura ambiente durante meia hora.

A absorbância foi medida em 490 nm contra o branco apropriado. Na determinação da curva padrão de carboidratos foram utilizadas soluções de glicose em diferentes concentrações e os resultados foram expressos em mg de glicose/g de tecido fresco.

2.2.2.6 Peroxidase

Para a determinação da enzima peroxidase foi utilizado o método espectrofotométrico direto, através da medida da conversão de guaiacol a tetraguaiacol (HAMMERSCMIDT; NUCKLES; KUC, 1982). Em uma cubeta de vidro de 3 mL foi colocado 0,1mL de extrato protéico (ver item 2.2.2.2.) ao qual se adicionou 2,9 mL de tampão de reação (306 µL de peróxido de hidrogênio e 250 µL de guaiacol em 100 mL de tampão fosfato 0,01M – pH 6,0). A leitura foi feita pela alteração na absorção a 470 nm. A atividade da enzima foi expressa em unidade de asbsorbância/ min/ mg de proteína.

2.2.2.7 β-1,3- glucanase

A atividade de -1,3-glucanase foi determinada pela quantificação colorimétrica da glicose liberada do substrato laminarina através da dosagem de açúcares redutores liberados, utilizando o reagente ácido 3,5 dinitrosalicílico (ADNS) (MILLER, 1959). Para isto, adicionou-se 25 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), 125 µL de laminarina (4,0 mg/mL) e 100 µL da amostra (extrato protéico) em um microtubo de 2 mL. A reação foi incubada, em "banho-maria", a 40ºC durante 1 hora. Passado este período, a reação foi paralisada com a adição de 125 µL do reagente ADNS e aquecida em água fervente por 5 minutos. Os tubos foram então resfriados em gelo, e a solução diluída em 1,25 mL de água deionizada (ABELES; FORRENCE, 1970). O material foi homogeneizado e a leitura da absorbância foi feita a 540 nm com o auxílio de um espectrofotômetro, contra o branco apropriado. Foram usadas soluções de glicose nas concentrações de 0,1 a 1 mg/mL para a determinação da curva padrão da -1,3 - glucanase. Os resultados foram expressos em ug de glicose liberada / hora/ mg de proteína.

Fitoplasma

2.2.3 Avaliação de possíveis hospedeiros para o fitoplasma

Três espécies botânicas foram avaliadas como possíveis hospedeiros alternativos para o fitoplasma do enfezamento do milho, ou seja, capim braquiária (*B. decumbens*), capim colonião

(*P. maximum*) e capim marmelada (*B. plantaginea*). Para isto, foi realizada a transmissão do fitoplasma a partir de plantas de milho, experimentalmente infectadas, para plantas pertencentes a cada uma destas três espécies. Sementes destas espécies foram pré-germinadas em papel de filtro umedecido e, após sua germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos de 1,5 L de capacidade, contendo como substrato uma mistura de solo, areia e matéria orgânica.

Os ensaios foram conduzidos com duas repetições, sendo que 5 e 10 plantas de cada uma das espécies testadas foram inoculadas com o espiroplasma, no primeiro e segundo ensaio, respectivamente. As plantas foram inoculadas quando estavam no estádio de 3 a 4 folhas, usando-se 10 cigarrinhas infectivas/planta, confinadas durante 4 dias por meio de gaiolas feitas de garrafas plásticas de 2 L (Figura 3). Como controle da transmissão do fitoplasma, plantas de milho pipoca cv. Zélia também foram inoculadas com insetos da mesma população infectiva de cigarrinhas. Após o período de confinamento, todas as plantas foram mantidas em casa telada e pulverizadas com inseticida piretróide lambda-cialotrina para a eliminação do vetor.

Amostras destas plantas inoculadas foram coletadas aos 60 dias após a inoculação e o DNA total foi extraído (ver item 2.2.1.4) e submetido aos testes de duplo PCR. Os pares de iniciadores R16 P1/Tint e R16 F2n/R2 e/ou R16 P1/P7 e R16 (I)F1/(I)R1 foram utilizados para a detecção do patógeno. Uma das plantas dentre aquelas que apresentaram resultados positivos, dentro de cada uma das espécies testadas, foi utilizada como planta fonte de fitoplasma para cigarrinhas sadias adquirirem o patógeno.

Para aquisição, ninfas de segundo e/ou terceiro ínstar da colônia sadia de *D. maidis* foram transferidas para gaiolas (Figura 3A) contendo isoladamente as plantas fontes. As cigarrinhas permaneceram sobre estas plantas por dois dias, e, posteriormente, estas plantas foram substituídas por plantas sadias de milho, as quais abrigaram os insetos durante um período de latência de aproximadamente 22 dias.

Após a de latência, a partir de cada uma das plantas fontes foram inoculadas dez plantas de milho da cultivar Zélia, usando-se dez insetos por planta. A inoculação foi feita com o auxílio de garrafas pet de 2 L, como descrito no item 2.2.1.3. Dez plantas da cultivar Zélia foram inoculadas com 10 insetos sadios/planta, servindo como testemunhas para o ensaio.

A transmissão do fitoplasma foi avaliada semanalmente, buscando-se identificar sintomas típicos da doença. A partir dos 60 dias após a inoculação, folhas foram coletadas para extração de DNA, visando a detecção do patógeno por PCR.

2.2.3.1 Condições de PCR para o fitoplasma

A extração rápida de DNA foi conduzida pela metodologia de Doyle e Doyle (1987). Diferente do que foi apresentado anteriormente para o espiroplasma, para a amplificação do fragmento correspondente ao 16S rDNA do fitoplasma foi empregado o duplo PCR, usando-se os iniciadores universais (“primers”) R16 P1/P7 ou R16 P1/Tint na primeira reação. O produto amplificado foi diluído em água deionizada na proporção de 1:50 v/v e usado como molde para a segunda reação com o par R16 F2n/R2 e/ou o par R16 (I)F1/(I)R1. Este último par é específico para a identificação de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI e amplifica fragmentos de DNA de 1,1 kb. Os iniciadores R16 F2n/R2 amplificam uma seqüência de nucleotídeos de aproximadamente 1,2 kb do DNA genômico dos fitoplasmas

Quando os iniciadores R16 P1/Tint foram utilizados, o termociclador foi programado para 30 ciclos, compreendendo as etapas: 1 minuto a 94ºC para a etapa de desnaturação do ácido nucléico, 1 minuto a 56ºC para o anelamento e 2 minutos a 72ºC para a extensão. Para os iniciadores R16 P1/P7, R16 F2n/R2 e R16 (I)F1/(I)R1 utilizou-se um programa de 35 ciclos, já descrito no item 2.2.1.4.2.

As seqüências dos iniciadores utilizados encontram-se descritas abaixo:

R16 P1- 5’AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3’ (DENG; HIRUKI, 1991)

R16 P7- 5’CGT CCT TCA TCG GCT CTT3’ (SMART et al., 1996)

R16 Tint- 5’TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C3’ (SMART et. al., 1996)

R16 F2n- 5’GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG3’ (GUNDERSEN; LEE, 1996)

R16 R2- 5’TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G3’(GUNDERSEN; LEE, 1996)

R16 (I)F1 - 5’ TAA AAG ACC TAG CAA TAG 3’(LEE et al., 1994)

R16(I)R1 - 5’CAA TCC GAA CTG AGA CTG T (LEE et al., 1994)

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Avaliação de possíveis hospedeiros para o espiroplasma

2.3.1.1 Detecção de espiroplasma

Dentre as plantas de milho inoculadas, as quais serviram de controle positivo, 80% delas apresentaram sintomas de enfezamento pálido. Os sintomas predominantes foram listras cloróticas que se estendiam no limbo foliar das folhas e encurtamento de entrenós, que resultou em enfezamento da planta. Estes sintomas estão de acordo com aqueles descritos por Nault (1980), que os considera como sintomas característicos incitados por este patógeno em plantas de milho.

A presença do espiroplasma foi detectada nas amostras de milho que apresentaram os sintomas da doença, através da amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 0,5 kb, os quais foram visualizados na forma de bandas no gel de agarose. Nenhuma banda foi observada nas reações de PCR onde DNA de plantas de milho sadias ou água foram usadas como controles negativos. A presença de bandas de 0,5 kb são típicas para o espiroplasma do enfezamento pálido, quando o par de primers CSSF1/R1 são empregados em PCR (BARROS et al., 2001). Desta maneira, a observação dos sintomas típicos de enfezamento associada à detecção do espiroplasma, confirmaram o sucesso da inoculação, validando o teste para avaliação das espécies vegetais como potenciais hospedeiros alternativos deste patógeno.

Embora as plantas de milho tenham mostrado sintomas da doença e permitido a detecção do patógeno, em nenhuma das plantas pertencentes às espécies de daninhas e forrageiras inoculadas ocorreu a manifestação de sintomas da doença. Os testes de PCR, conduzidos com DNA extraído destas plantas e os primers específicos para espiroplasmas, não acusaram a ocorrência do patógeno nos tecidos vegetais.

Estes resultados são concordantes com os relatos de literatura que apontam uma gama estreita de hospedeiros alternativos para o agente do enfezamento do milho, representados por algumas espécies restritas aos gêneros *Zea*, *Tripsacum* e *Euchlaena* (NAULT, 1980). Embora *S. kunkelii* tenha sido transmitido experimentalmente para o sorgo e para algumas dicotiledôneas como fava, vinca, rabanete, mostarda e espinafre, a transmissão do patógeno foi obtida através de cigarrinhas vetoras pertencentes a espécies distintas de *D. maidis* (ROSENKRANZ, 1970; NAULT, 1980). Especificamente no caso do sorgo, foi demonstrado que *D. maidis* não foi capaz

de transmitir o molicute, sendo este, no entanto, transmitido pela cigarrinha *G. nigrifons* (ROSENKRANZ, 1970). Para as dicotiledôneas citadas, o agente transmissor foi a cigarrinha *E. varigatus* (NAULT, 1980). Semelhantemente, os resultados obtidos no presente estudo revelaram que a cigarrinha *D. maidis*, um vetor muito eficiente para o espiroplasma do enfezamento pálido do milho, provavelmente não atue como vetor capaz de transmitir o patógeno para as espécies aqui avaliadas como possíveis hospedeiros alternativos.

Esta informação é relevante quanto ao aspecto epidemiológico, pois *D. maidis* é a mais importante espécie vetora do espiroplasma no território brasileiro e as espécies botânicas avaliadas neste estudo são aquelas encontradas com maior frequência no interior ou nas adjacências das áreas cultivadas com milho. Os resultados aqui obtidos sugerem que o papel destas espécies como possíveis hospedeiros alternativos talvez não seja relevante e caso o espiroplama seja encontrado naturalmente nestas espécies, provavelmente outras cigarrinhas, que não *D. maidis*, sejam responsáveis pela transmissão do patógeno para as mesmas. Assim, fica a evidência de que a diversidade de hospedeiros alternativos pode estar condicionada à diversidade de cigarrinhas vetoras existentes na natureza.

2.3.1.2 Sobrevivência da cigarrinha vetora nas espécies de forrageiras e ervas daninha

A análise estatística mostrou que nas primeiras 24 h após o início do confinamento das cigarrinhas nas plantas, a sobrevivência do inseto em sorgo não diferiu daquela observada em plantas de milho (Tabela 1). Neste caso, em média, mais de oito insetos estavam vivos ao final das primeiras 24 h após o confinamento. Para as demais espécies de gramíneas, a sobrevivência do inseto variou significativamente em relação ao milho e mesmo entre as diversas espécies testadas.

Na segunda contagem, realizada 48 h após o confinamento, houve uma significativa redução no número de insetos vivos contados nas diversas espécies vegetais, porém a população foi mantida praticamente inalterada nas plantas de milho. Nas avaliações realizadas após 72 e 96 horas, os resultados se mostraram similares à quantificação dos insetos feita após 48 h do início do confinamento. No entanto, para algumas gramíneas houve uma tendência de redução da população da cigarrinha ao longo do tempo.

Os resultados de sobrevivência do vetor nas plantas de sorgo obtidos no presente trabalho diferem daqueles relatados por Waquil (1997), que observou a ocorrência de ninfas e ovos de *D.*

maidis em plantas desta espécie, alertando que o sorgo poderia atuar como hospedeiro do inseto. O sorgo também foi considerado como potencial hospedeiro para a cigarrinha do milho, em trabalho realizado por Pitre (1967). Este autor conduziu ensaios com várias espécies de gramíneas e relatou que mesmo após 5 dias de confinamento, aproximadamente 70% das cigarrinhas se mantinham vivas. No entanto, segundo Kunkel (1946), o fato de *D. maidis* sobreviver curtos períodos em algumas gramíneas não significa que o inseto seja capaz de prosperar nestas plantas. A baixa sobrevivência do vetor verificada em plantas de sorgo, no presente estudo, talvez possa ser justificada pela variedade aqui utilizada não oferecer condições favoráveis para o desenvolvimento do inseto, contrariamente ao que se constatou em outros trabalhos.

Apesar de ter sido revelada uma curta sobrevivência do inseto em todas as espécies aqui avaliadas, deve ser ressaltado que *D. maidis* é capaz de transmitir o espiroplasma para o milho após períodos de acesso a inoculação tão curtos como 15 minutos (TSAI; FALK, 1988). É evidente que a eficiência de transmissão neste caso é menor, da ordem de 15%, quando comparada com maiores períodos de acesso, como um período de 4 dias, em que ocorre índices de 100% de transmissão (NAULT, 1980). Deste modo, talvez não possa ser atribuído unicamente à baixa sobrevivência do inseto o fato de não se observar a transmissão do patógeno para as espécies de plantas avaliadas neste trabalho. Esta consideração vem ao encontro do foi referido anteriormente para justificar a não detecção do patógeno nas diversas espécies testadas. Assim, a ausência do espiroplasma nos tecidos de plantas inoculadas, talvez possa ser realmente atribuída à baixa capacidade de *D. maidis* em transmitir o agente do enfezamento para as diferentes espécies de plantas usadas no experimento.

Tabela 1 - Sobrevivência média de *Dalbulus maidis* em forrageiras e ervas-daninhas, avaliada pela contagem de insetos vivos após 24, 48, 72 e 96 horas do confinamento de dez cigarrinhas por planta, em dez plantas de cada espécie botânica avaliada

	Tempo de inoculação							
Planta hospedeira	**24 horas**		**48 horas**		**72 horas**		**96 horas**	
Milho	9,72 ± 0,07	a	9,5 ± 0,10	a	9,32 ± 0,14	a	9,12 ± 0,14	a
Sorgo	8,6 ± 0,22	ab	1,1 ± 0,31	b	0 ± 0,00	b	0,00 ± 0,00	b
Massambará	7,7 ± 0,42	b	0,5 ± 0,30	b	0,3 ± 0,21	b	0,30 ± 0,21	b
Colonião	4,8 ± 0,30	c	0,9 ± 0,31	b	0,9 ± 0,16	b	0,80 ± 0,16	b
Carrapicho	3 ± 0,39	cd	0,5 ± 0,40	b	0,8 ± 0,47	b	0,70 ± 0,47	b
Beldroega	2,7 ± 0,37	de	0,2 ± 0,13	b	0,1 ± 0,10	b	0,00 ± 0,00	b
C. Gordura	2,5 ± 0,42	def	0,3 ± 0,21	b	0,3 ± 0,00	b	0,30 ± 0,15	b
Camelote	2 ± 0,42	def	0,6 ± 0,22	b	0,0 ± 0,00	b	0,00 ± 0,00	b
Braquiária	1,6 ± 0,38	def	0,7 ± 0,25	b	0,7 ± 0,26	b	0,45 ± 0,26	b
C. Elefante	0,9 ± 0,79	ef	0,0 ± 0,00	b	0,0 ± 0,00	b	0,00 ± 0,00	b
C. Marmelada	0,6 ± 0,25	f	0,1 ± 0,10	b	0,1 ± 0,10	b	0,10 ± 0,10	b
Milheto	0,4 ± 0,16	f	0,3 ± 0,15	b	0,2 ± 0,13	b	0,20 ± 0,13	b

Resultados apresentam a média ± erro padrão. Tratamentos com médias identificadas pela mesma letra, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de significância $p<0,05$

2.3.2 Alterações bioquímicas em plantas de milho causadas pelo espiroplasma do enfezamento pálido

2.3.2.1 Detecção do espiroplasma

Amostras de plantas inoculadas e não inoculadas com o espiroplasma foram coletadas no momento da inoculação (tempo zero) e aos 10, 20, 40, 60 e 80 dias após a inoculação, para a condução de PCR, visando associar a presença do patógeno com possíveis alterações nos compostos químicos do hospedeiro, avaliados neste trabalho. A presença do espiroplasma foi evidenciada pela amplificação de fragmentos genômicos de 0,5 kb, visualizados na forma de bandas em géis de agarose. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Detecção de *Spiroplasma kunkelii* em híbridos de milho resistente e suscetível, inoculados e não inoculados experimentalmente, avaliados aos 0, 10, 20, 40, 60 e 80 dias após a inoculação. Estão representados o número de plantas com resultado positivo para presença do patógeno em relação ao número total de plantas inoculadas

Períodos de Avaliação	Resistente Inoculado	Resistente Não Inoculado	Suscetível Inoculado	Suscetível Não Inoculado
0 dias	0/10	0/10	0/10	0/10
10 dias	0/10	0/10	0/10	0/10
20 dias	0/10	0/10	2/10	0/10
40 dias	5/10	0/10	6/10	0/10
60 dias	5/10	0/10	7/10	0/10
80 dias	9/10	0/10	10/10	0/10

Para o híbrido suscetível, a presença do espiroplasma foi constatada, por PCR, a partir dos 20 dias após a inoculação, enquanto que para o híbrido resistente a primeira detecção foi verificada aos 40 dias após o início da infecção (Tabela 2). Os sintomas apareceram a partir dos 40 dias, quando 3 plantas sintomáticas foram observadas dentre as 10 plantas inoculadas para o híbrido suscetível. Aos 60 dias, 7 plantas do híbrido suscetível e 3 do híbrido resistente apresentavam sintomas de enfezamento. Aos 80 dias, todas as plantas do híbrido suscetível se mostraram sintomáticas, enquanto 8 das 10 plantas do híbrido resistente exibiram sintomas. Os sintomas não diferiram em intensidade, porém foram mais precoces nas plantas do híbrido suscetível.

2.3.2.2 Proteína Total

Os resultados da análise de proteína total nos diferentes estádios de desenvolvimento dos híbridos resistente e suscetível estão apresentados nas Figuras 4 e 5. Os gráficos mostram um aumento na quantidade de proteína tanto para o híbrido resistente como para o suscetível até 20 dias após a inoculação (d.a.i.) do patógeno. Aos 40 dias o teor de proteína total diminui sensivelmente e permanece praticamente estável até o final do período de avaliação.

O híbrido suscetível (Figura 4) apresenta uma diferença estatisticamente significativa, quando comparamos as plantas inoculadas e não inoculadas, aos 60 d.a.i., embora a partir dos 20 d.a.i. o tratamento inoculado já apresente menores quantidades de proteína total que o não inoculado. Esta redução no conteúdo protéico em folhas de plantas infectadas por fitoplasma, também foi relatada por Léon et al. (1996) para o patossistema coqueiro e fitoplasma do amarelecimento foliar e por Bertamini e Nedunchezhian (2001) para videira infectada pelo agente

do amarelo da videira. Este resultado foi atribuído a um decréscimo nas subunidades da rubisco, enzima que constitui 50% ou mais do total de proteínas solúveis das folhas. Bertamini et al., (2002), que obtiveram o mesmo tipo de resultado para o fitoplasma do superbrotamento de ramos da macieira, também atribuíram este efeito ao decréscimo na síntese da rubisco, porém aliada aos danos ocasionados aos cloroplastos e/ou inibição da síntese protéica causada pelo patógeno. Para plantas de milho inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho, Junqueira (2003) observou decréscimo no conteúdo protéico apenas para um dos híbridos avaliados; os demais houve um aumento na quantidade de proteínas totais das plantas inoculadas, quando comparadas com aquelas não inoculadas. O trabalho ainda abordou a avaliação de dois híbridos de milho, um suscetível (XLX520) e um resistente (FT9006) em diferentes estádios fenológicos, tendo sido constatado um aumento no conteúdo de proteína total quando o patógeno estava presente nos tecidos das plantas.

O híbrido resistente apresentou, ao longo do tempo, variação muito pequena na quantidade de proteínas, independentemente das plantas terem sido ou não inoculadas (Figura 5); no entanto, em todos os períodos de avaliação, exceção feita para o período de 40 d.a.i., houve a tendência de maior produção de proteína pelas plantas inoculadas. Destaca-se, no entanto, que apenas no décimo d.a.i. foi observada uma diferença estatisticamente significativa para este composto nas plantas portadoras e não portadoras do fitoplasma.

Aumento nos teores de proteínas em híbridos resistentes ao *S. kunkelii* também foi observado por Souza et al. (2003), os quais avaliaram estes compostos em híbridos de milho resistentes e suscetíveis, em dois períodos: 10 dias após a emergência (antes da inoculação) e na fase de enchimento dos grãos de milho. Como resultado, as plantas resistentes ao enfezamento pálido apresentaram maiores valores no teor de proteínas solúveis no estádio de plântula, não havendo diferenças na fase de enchimento de grãos.

O aumento na quantidade de proteína total é resultante da interação patógeno-hospedeiro, a qual ativa os mecanismos de defesa da planta, levando à elevação do nível de algumas proteínas, como as chamadas proteínas-RP, relacionadas ao processo de patogênese (LEITE; PASCHOLATI, 1995).

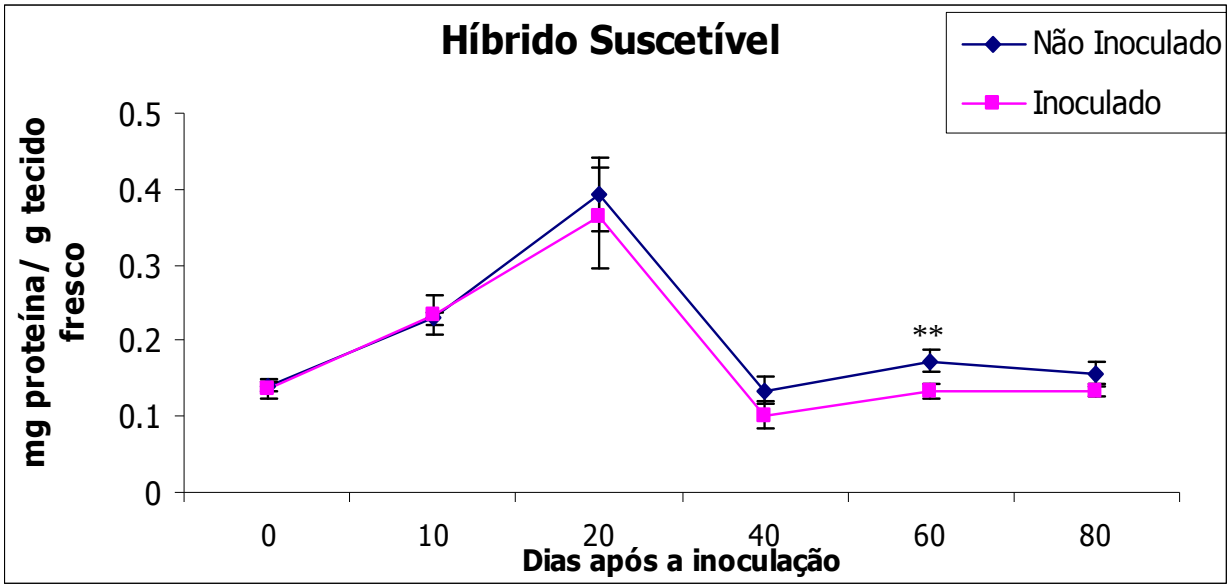

Figura 4 - Teor de proteína solúvel do tecido foliar de milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido suscetível inoculado (▬)e híbrido suscetível não inoculado (◆). Barras indicam a média ± erro padrão
** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

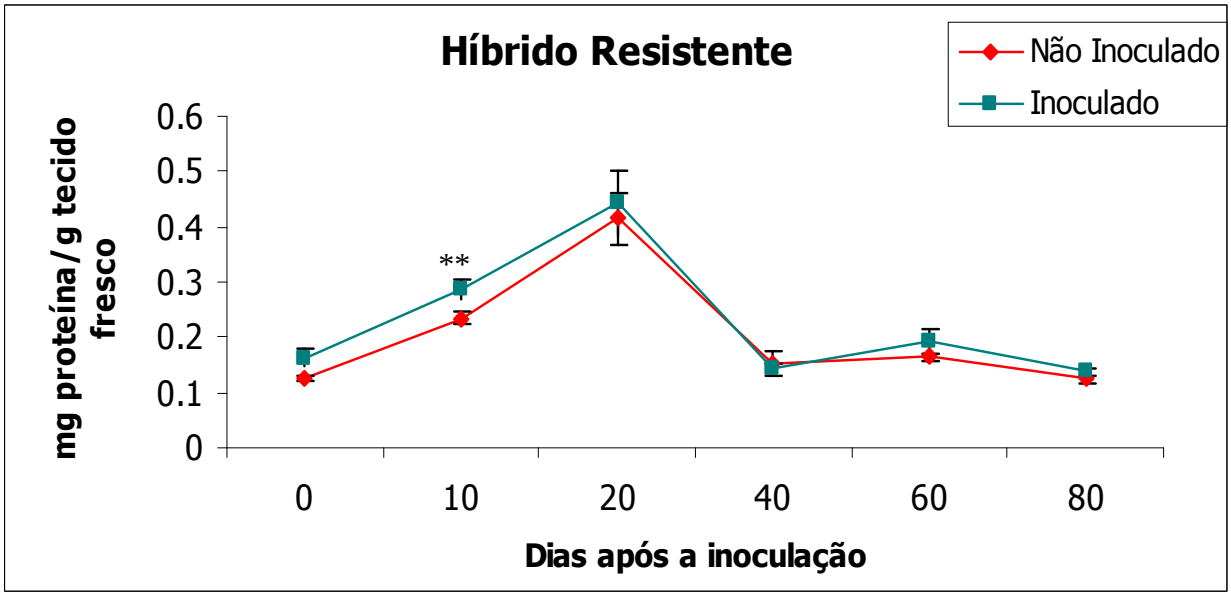

Figura 5 - Teor de proteína solúvel do tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido resistente inoculado (■)e híbrido resistente não inoculados (◆). Barras indicam a média ± erro padrão.
** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

2.3.2.3 Clorofila Total

Os resultados da avaliação do conteúdo de clorofila total das plantas podem ser visualizados nas Figuras 6 e 7. Os valores apresentados demonstraram que após um leve decréscimo inicial, há um significativo aumento na quantidade de clorofila total para os híbridos resistentes e suscetíveis. Esse crescimento perdura até aos 20 d.a.i., havendo, então, uma diminuição gradativa na quantidade de clorofila total, até o final dos períodos de avaliação (80 d.a.i.). As análises da clorofila **a** e da clorofila **b** mostraram que ambas apresentaram o mesmo comportamento.

Diferenças estatísticas entre os tratamentos aplicados ao híbrido suscetível foram mostradas a partir dos 10 dias, sendo que a quantidade total de clorofila produzida pelo híbrido inoculado foi significativamente menor do que aquela encontrada no híbrido não inoculado.

Aos 10 dias ainda não havia sido detectado o patógeno na planta (Tabela 2), embora Gussie; Fletcher e Claypool (1995) tenham demonstrado que é possível encontrar o patógeno mesmo nos períodos iniciais de desenvolvimento da doença. Aos 14 dias após a inoculação, estes autores detectaram, através do teste de ELISA, o patógeno em plântulas de milho. A ausência de um resultado positivo para presença do espiroplasma aos 10 d.a.i., quando já se observa algumas alterações no conteúdo de clorofila na planta, pode ser atribuída à uma distribuição desuniforme do espiroplasma na planta, o que dificulta sua detecção. Como consequência desta distribuição errática, muitas vezes se observa sintomas claros da doença, porém não se consegue evidenciar a presença do agente nestas mesmas plantas (OLIVEIRA et al., 2002).

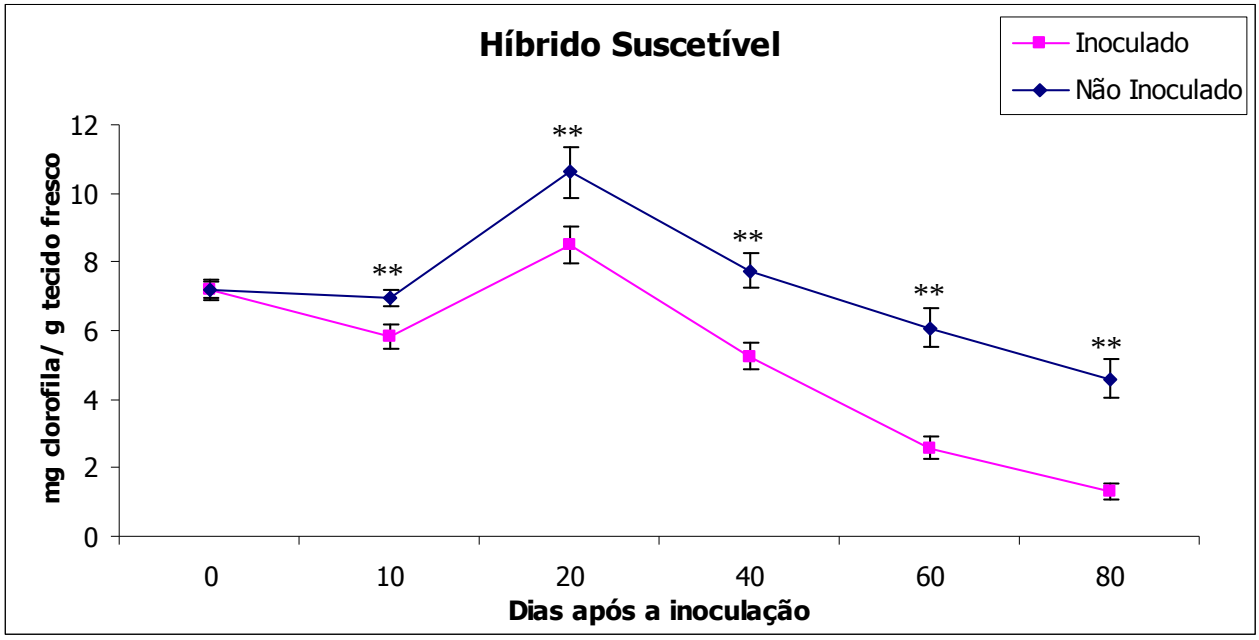

Figura 6 - Teor de clorofila total do tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido suscetível inoculado (—■—) e híbrido suscetível não inoculado (—◆—). Barras indicam a média ± erro padrão. ** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

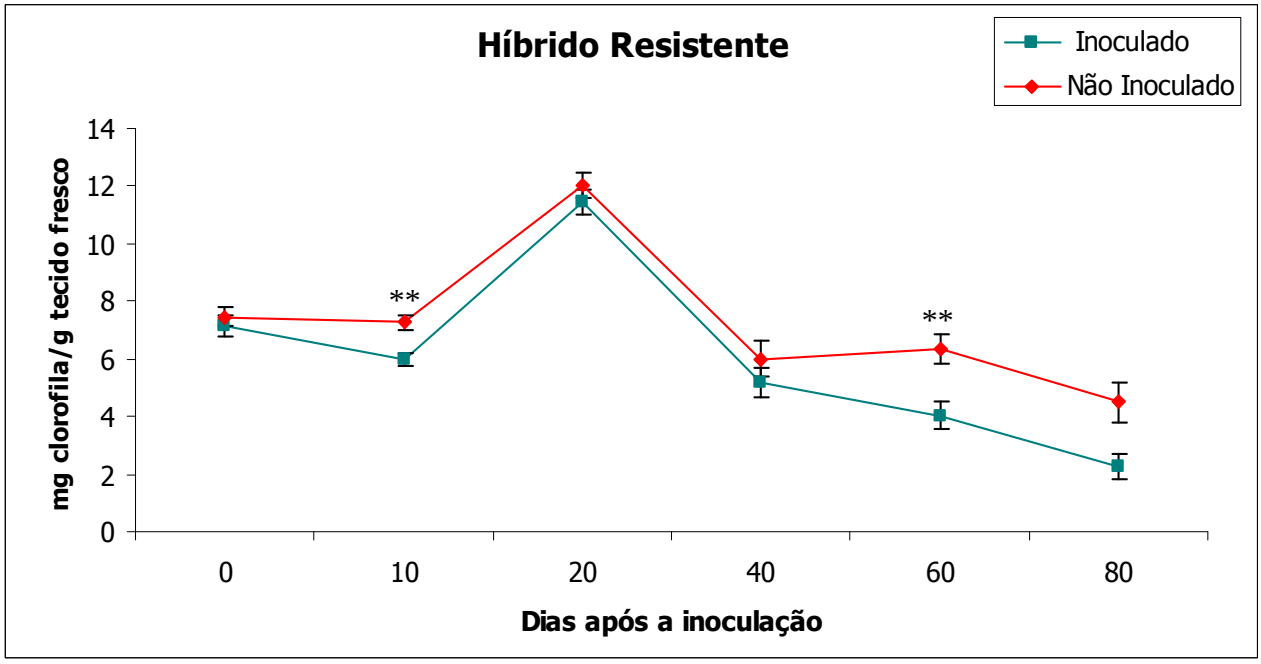

Figura 7 - Teor de clorofila total do tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido resistente inoculado (—■—) e híbrido suscetível não inoculado (—◆—). Barras indicam a média ± erro padrão. ** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

Alguns dos sintomas causados pelo espiroplasma em plantas de milho são clorose marginal nas folhas e o desenvolvimento de manchas cloróticas na base das folhas recém emergidas do cartucho (NAULT, 1980). Aparentemente estes sintomas estão relacionados ao decréscimo de clorofila nos tecidos foliares. Para Choi et al. (2004) isto ocorre devido ao bloqueio da biossíntese de clorofila pela glicose ou ácido succínico. Resultado idêntico foi relatado para videira infectada pelo fitoplasma do amarelo (BERTAMINI; NEDUNCHEZHIAN, 2001) e para macieira portadora do fitoplasma do superbrotamneto de ramos (BERTAMINI; GRANDO; NEDUNCHEZHIAN, 2003). Em ambos os casos foi observada uma correlação entre o progresso da doença, avaliado pelo aparecimento de sintomas, e a diminuição do conteúdo de clorofila total. Nessa plantas, os conteúdos de clorofila **a** e **b** também apresentaram decréscimo, enquanto foi verificado um aumento na atividade de clorofilase nas folhas. Estas alterações parecem estar diretamente relacionadas à inibição da taxa fotossintética e à destruição dos pigmentos fotossintéticos, resultando em uma redução na fixação de CO_2. León et al. (1996) obtiveram estes resultados para coqueiros afetados pelo fitoplasma do amarelecimento foliar (LY). Através da correlação entre estes resultados e outros processos aspectos bioquímicos alterados, como decréscimo no conteúdo protéico, diminuição dos pigmentos carotenóides e redução na taxa fotossintéticas das plantas, os referidos autores propuseram uma relação entre a doença e o processo de senescência da planta, sendo considerado este um dos mecanismos de patogenicidade deste fitoplasma. Essa redução no conteúdo de clorofila total também foi relatada por Junqueira (2003) para o milho inoculado com fitoplasma, sugerindo que esta redução estaria relacionada a uma interferência do patógeno na taxa fotossintética da planta.

2.3.2.4 Fenóis Totais

Os resultados gerados pela análise dos compostos fenólicos produzidos pelos híbridos de milho em resposta a presença do patógeno se encontram nas figuras 8 e 9. Os dois híbridos apresentaram dois picos de produção de compostos fenólicos ao longo do tempo, sendo que para o híbrido resistente o primeiro pico ocorreu aos 10 d.a.i. e o segundo aos 60 d.a.i.; enquanto para o híbrido suscetível, o primeiro pico foi verificado aos 20 d.a.i. e o segundo aos 60 d.a.i..

Para os híbridos resistente e suscetível, os valores encontrados para os compostos fenólicos foram superiores para as plantas inoculadas em comparação aquelas não inoculadas, porém diferença estatística foi constatada apenas para o híbrido resistente, aos 20 d.a.i..

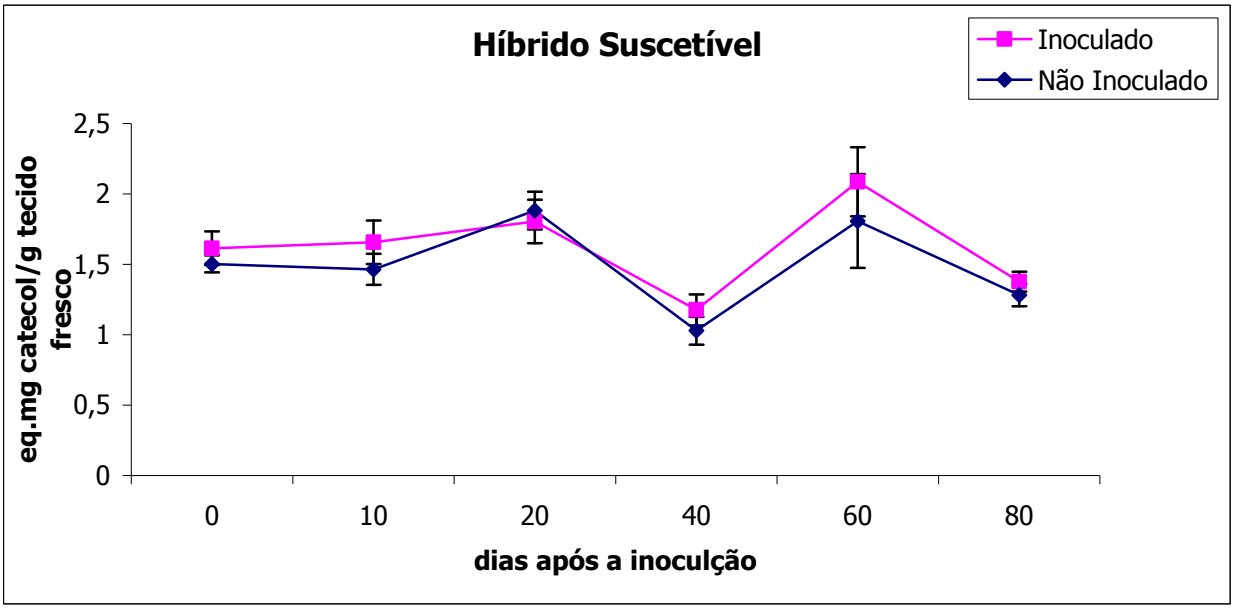

Figura 8 - Teor de fenol total do tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido suscetível inoculado (—■—)e híbrido resistente não inoculado (—♦—). Barras indicam a média ± erro padrão.** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

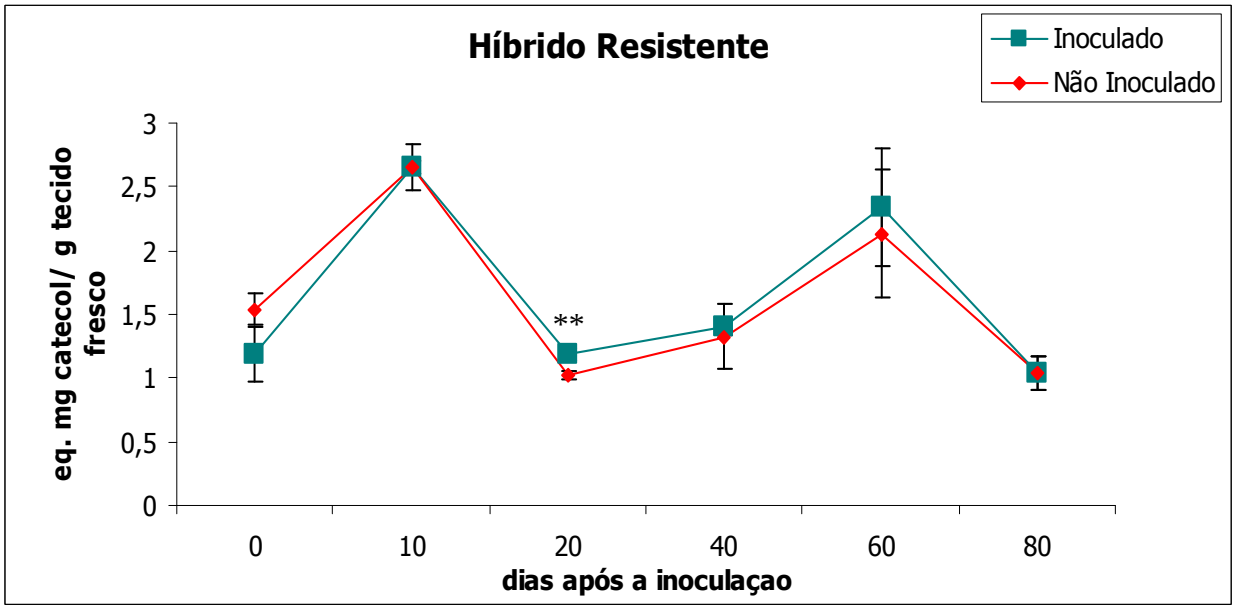

Figura 9 - Teor de fenol total do tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido resistente inoculado (—■—)e híbrido resistente não inoculado (—♦—). Barras indicam a média ± erro padrão. ** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

O aumento na produção de compostos fenólicos pelas plantas está diretamente relacionado ao aumento da resistência à infecção por patógenos e ao ataque de pragas, havendo também variações nos teores destes compostos em função do desenvolvimento das plantas e dos fatores do ambiente (SALGADO, 2009). Os compostos fenólicos são constituídos por um arsenal de substâncias diretamente relacionadas à defesa das plantas e, em geral, atuam através de mecanismos de resistência pré e pós-formados. No primeiro caso, são constituintes das plantas e estão diretamente relacionados à resistência de não hospedeiros; no segundo, são formados em resposta à presença do patógeno e fazem parte de uma resposta ativa de defesa da planta (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

O aumento na quantidade de fenóis, mais especificamente na quantidade de polifenóis, ligninas e suberinas foi reportado por Musetti et al. (2000) em plantas de ameixa e maçã afetadas pelos agentes do superbrotamento. Os autores demonstraram uma relação entre estes metabólitos e a defesa das plantas contra doenças sistêmicas, como aquelas causadas pelos fitoplasmas. O aumento observado na lignificação destas plantas pode ser interpretado como uma tentativa da planta em restringir a multiplicação do fitoplasma nos vasos do floema. Outros compostos fenólicos observados também foram alterados na presença de molicutes. Para cana-de-açúcar, Fontaniella et al. (2003) observaram um aumento na produção de ácidos clorogênicos, siríngico e ferúlico em plantas apresentando a síndrome do amarelecimento foliar, causada por um fitoplasma.

Choi et al. (2004) utilizaram plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) inoculadas com 10 diferentes fitoplasmas e observaram um aumento de metabólitos relacionados à biossíntese de fenilpropanóides ou terpenóides, como o ácido clorogênico, o ácido logânico e a secologanina. Estes autores relataram um aumento de até 2 a 4 vezes na produção do ácido clorogênico pelas plantas infectadas, quando comparadas com plantas sadias. O ácido clorogênico parece servir como um indutor da síntese de fitoanticipinas, substâncias antibióticas produzidas em defesa das plantas ao ataque de patógenos, sendo os ácidos clorogênicos, siríngico e ferúlico os principais compostos encontrados nas plantas. Como exemplo da atividade do ácido clorogênico, plantas de fumo super-expressando fenilalanina amônia-liase, e em decorrência produzindo uma grande quantidade deste ácido, exibiram uma redução na suscetibilidade ao patógeno *Cercospora nicotina* (SHADLE et al., 2003). Para plantas de milho infectadas com fitoplasma, um aumento nos compostos fenólicos ao longo do desenvolvimento das plantas foi observado por Junqueira

(2003). O acréscimo na quantidade de fenóis totais foi verificado independente do híbrido analisado e da presença do patógeno, porém os valores foram maiores para os híbridos infectados pelo agente do enfezamento.

No presente trabalho, foram analisadas apenas as alterações quantitativas dos fenóis, sendo interessante uma avaliação qualitativa para melhor compreensão da atuação dos diversos compostos fenólicos nas plantas inoculadas com o patógeno.

2.3.2.5 Açúcares Totais

Quanto ao conteúdo de açúcares totais, as plantas inoculadas do híbrido suscetível apresentaram valores de carboidrato crescentes até os 60 d.a.i., seguido de uma leve redução destes valores no período compreendido entre os 60 e os 80 d.a.i.. Para as plantas não inoculadas foram registrados resultados semelhantes, diferindo para a avaliação feita aos 10 d.a.i., quando ocorreu um leve acréscimo. Observou-se diferença estatística entre os valores obtidos aos 20 d.a.i., quando o valor do açúcar total se mostrou maior nas plantas inoculadas do híbrido suscetível.

O híbrido resistente apresentou até os 40 d.a.i. valores muito próximos entre os dois tratamentos, plantas inoculadas e não inoculadas. Aos 60 d.a.i. houve significativo aumento na quantidade de açúcar para o híbrido inoculado, voltando a decrescer aos 80 d.a.i. (Figuras 10 e 11).

O acúmulo de açúcares em folhas de plantas infectadas por fitoplasmas vem sendo relatado por diversos autores. Plantas de maçã infectadas pelo fitoplasma do superbrotamento de ramos e de videira portadoras do fitoplasma do amarelo exibiram um aumento no conteúdo de açúcar total em suas folhas, quando comparadas com folhas de plantas sadias (BERTAMINI et al., 2003; BERTAMINI; NEDUNCHEZHIAN, 2001). No caso da síndrome do amarelecimento foliar na cana-de-açúcar, causada por um fitoplasma, a doença foi responsável por dobrar o conteúdo de glicose nas plantas infectadas (FONTANIELLA et al., 2003). Plantas infectadas por fitoplasmas geralmente apresentam um aumento da quantidade de açúcares nas folhas e uma diminuição dos mesmos no caule e nas raízes.

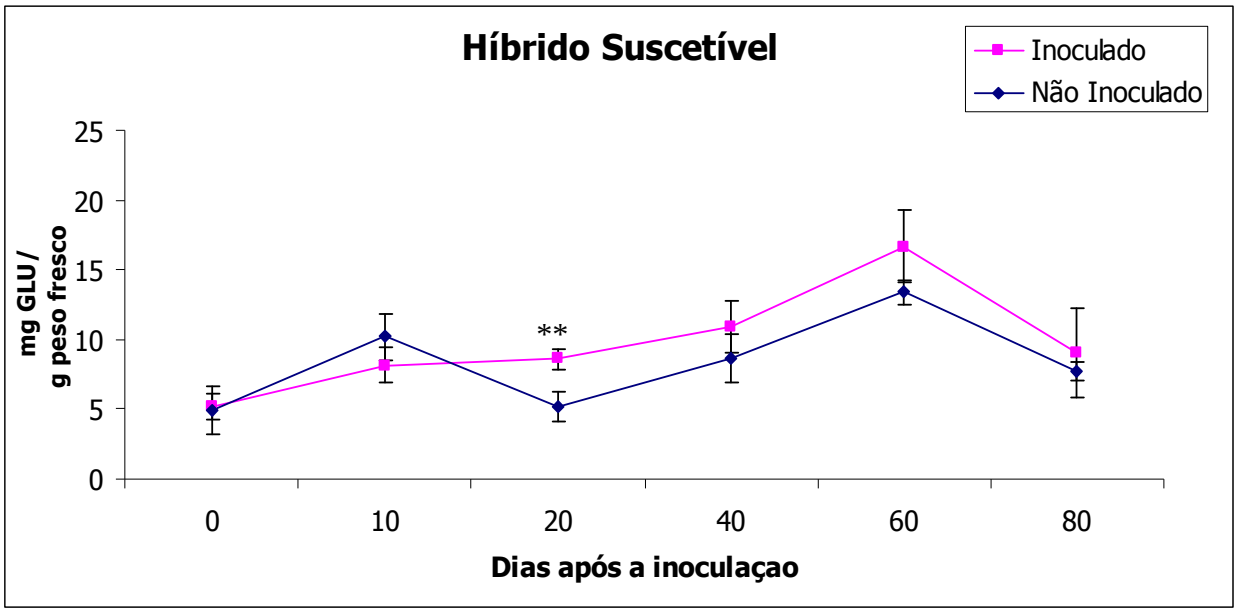

Figura 10 – Teor de Açúcar Total do tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido suscetível inoculado (—■—) e híbrido suscetível não inoculado (—◆—). Barras indicam a média ± erro padrão. ** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

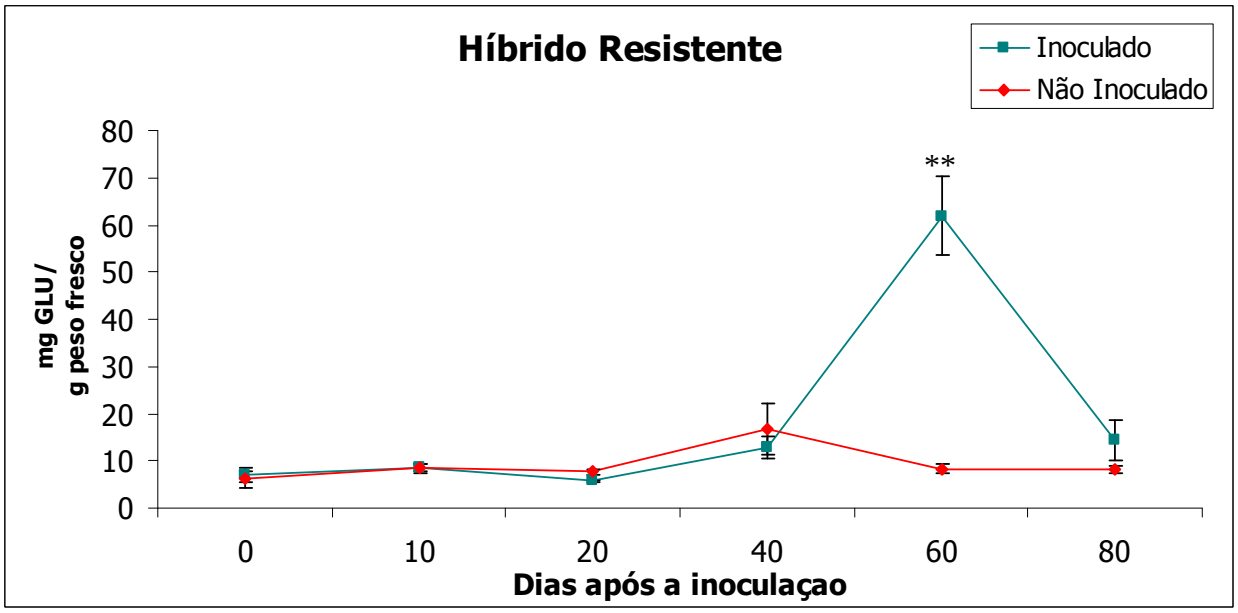

Figura 11 – Teor de Açúcar Total do tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido resistente inoculado (—■—)e híbrido resistente não inoculado (—◆—). Barras indicam a média ± erro padrão. ** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

Em plantas de vinca inoculadas com três diferentes fitoplasmas e de fumo infectadas também por um fitoplasma, Lepka et al., (1999) estudaram o conteúdo de glicose, frutose, sacarose, amido e aminoácidos. Os autores observaram alterações na distribuição de carboidrato nas plantas infectadas, havendo uma inibição da translocação deste composto; essas mudanças na translocação de fotossintatos possivelmente contribuíram para a expressão de sintomas da doença pelas plantas afetadas.

Maust et al. (2003) propuseram um modelo para a colonização de plantas de coqueiro pelo fitoplasma do amarelecimento foliar, sob o aspecto da alteração de açúcares e carboidratos provocados doença. Após a transmissão do fitoplasma para a planta, sua multiplicação no floema produziria uma redução no transporte de açúcares, levando ao acúmulo de carboidratos nas folhas, causaria inibição da fotossíntese e provocaria uma redução do fornecimento de açúcar das folhas para as raízes. O reduzido nível de carboidrato nas raízes levaria a uma diminuição da respiração da planta, ocorrendo alterações bioquímicas que afetariam a síntese de reguladores de crescimento, como as citocininas, causando mudanças fisiológicas no dossel das folhas, na senescência prematura e na abscisão de frutos e folhas. No entanto, permanece desconhecida a forma como os fitoplasmas reduzem o transporte da sacarose através do floema.

2.3.2.6 Enzimas

2.3.2.6.1 Peroxidase

As plantas inoculadas do híbrido suscetível apresentaram um aumento na atividade da enzima peroxidase, quando comparadas com aquelas não inoculadas (Figuras 12 e 13). As diferenças estatísticas foram observadas para as avaliações feitas aos 10 e 80 d.a.i.. Tanto para plantas inoculadas como não inoculadas, esta enzima apresentou um aumento gradativo na sua atividade ao longo do tempo, sendo que sua atividade máxima ocorreu aos 40 d.a.i. e, a partir deste período, sofreu uma redução.

Os índices de atividade desta enzima para o híbrido resistente foram semelhantes para os dois tratamentos, correspondentes a plantas inoculadas e não inoculadas. No entanto, aos 60 dias observou-se um aumento estatisticamente significativo para o tratamento inoculado. Justamente neste período foi possível detectar a presença do patógeno no híbrido resistente inoculado e visualizar os sintomas da doença em algumas das plantas, evidenciando que esta enzima parece estar diretamente relacionada aos mecanismos de defesa das plantas.

As peroxidases são enzimas que catalisam a oxi-redução entre peróxido de hidrogênio e vários redutores (HIRAGA, 2001). Elas estão amplamente distribuídas em todas as plantas, apresentando múltiplas isoformas e estão envolvidas em diversas reações celulares, como a oxidação de compostos fenólicos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de polissacarídeos, ligações com monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos e alongamento de células. Também possuem papel no crescimento e desenvolvimento de plantas e estão relacionadas aos mecanismos de defesa em relação aos patógenos e aos estresses abióticos (SBALCHEIRO; DENARDIN; BRAMMER, 2009). Segundo Asada (1992), a sua atividade pode ser alterada em função da resistência ou suscetibilidade da plantas ao patógeno, sendo que na maioria das vezes são as primeiras enzimas a terem sua atividade modificada quando a planta é submetida a uma condição de estresse. Devido a essa característica, esta enzima é muito utilizada como marcador bioquímico para estresses bióticos ou abióticos (SIEGEL, 1993).

O aumento na atividade da enzima guaiacol peroxidase na presença de fitoplasmas também foi relatado para o patossistema macieira e fitoplasma do superbrotamento de ramos (MUSETTI et al., 2004) e para plantas de damasco infectadas pelo agente do amarelo das rosáceas de caroço (MUSETTI et al., 2005). Estes resultados sugeriram que esta enzima estaria relacionada com a redução na intensidade dos sintomas.

No presente estudo, apesar das plantas apresentarem um aumento na quantidade de peroxidase, não foi possível relacionar esta alteração com a ativação nos mecanismos de resistência, uma vez que os sintomas foram observados aos 40 d.a.i. para o híbrido suscetível e aos 60 d.a.i. para o híbrido resistente. Para evidenciar a ativação dos mecanismos de resistência, os sintomas observados nas plantas infectadas deveriam ser retardados e/ou se apresentarem mais amenos em relação à intensidade a medida que houvesse teores mais elevados desta enzima nas plantas (JUNQUEIRA, 2003).

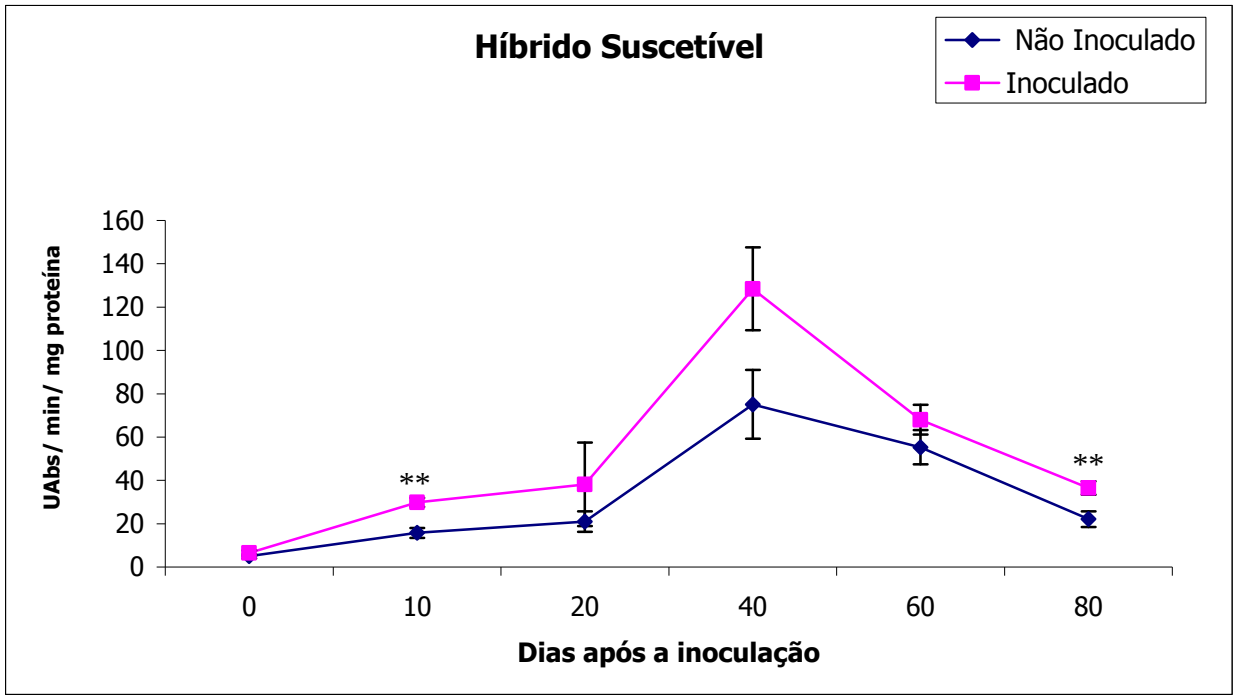

Figura 12 - Teor da atividade da peroxidase do tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido suscetível inoculado (—■—)e híbrido suscetível não inoculado (—◆—). Barras indicam a média ± erro padrão.** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

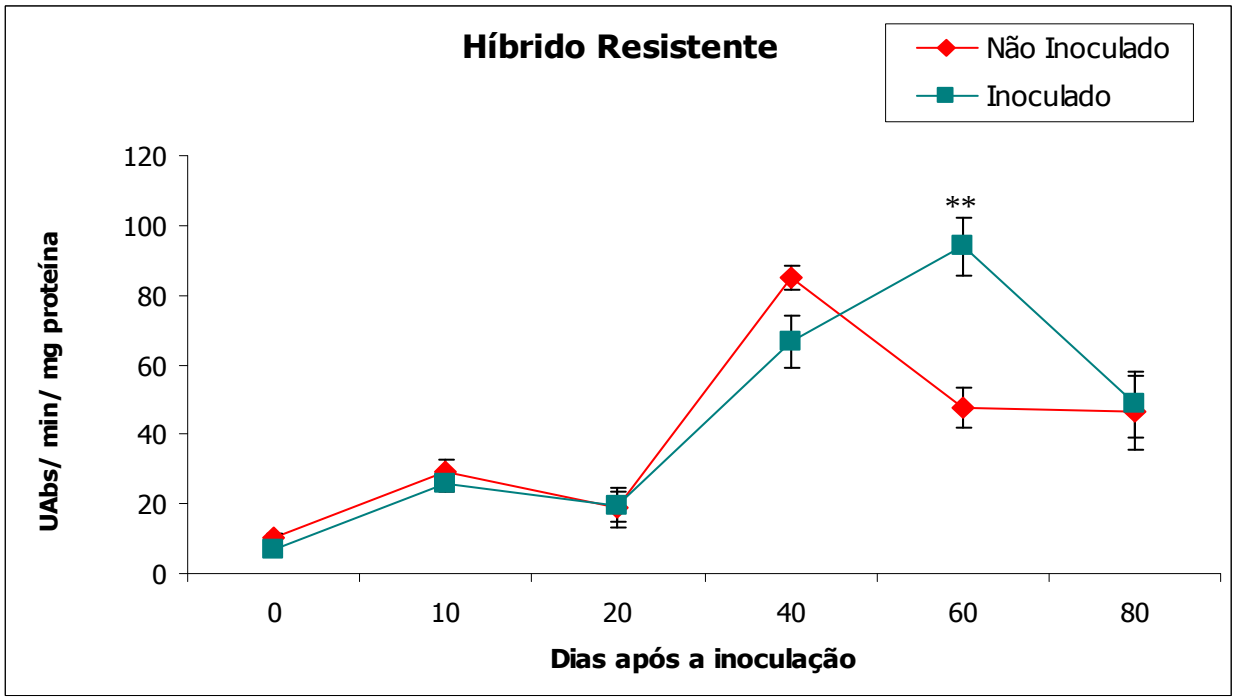

Figura 13 - Teor da atividade da peroxidase no tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido resistente inoculado (—■—) e híbrido resistente não inoculado (—◆—). Barras indicam a média ± erro padrão. ** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

2.3.2.6.2 β-1,3-glucanase

Os resultados obtidos para a análise da enzima -1,3-glucanase demonstraram que, de modo geral, ocorreu um aumento na sua atividade enzimática nos tratamentos representados pelas plantas inoculadas (Figuras 14 e 15).

Para o híbrido suscetível, os níveis da enzima, avaliados ao longo dos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas, foram semelhantes para os tratamentos inoculado e não inoculado. Nas primeiras avaliações, feitas no tempo zero e aos 10 d.a.i., os níveis permaneceram constantes, ocorrendo um leve decréscimo aos 20 d.a.i.. A atividade da enzima aumentou consideravelmente, atingindo seu máximo aos 40 d.a.i.. Avaliações feitas aos 60 d.a.i. mostraram diminuição da atividade enzimática, a qual permaneceu praticamente estável até o final do experimento.

Para o híbrido resistente, os resultados seguiram a mesma tendência daquela verificada para o híbrido suscetível. Neste caso, nas plantas inoculadas, o pico da atividade se iniciou aos 40 dias e perdurou até os 60 d.a.i., havendo diminuição da atividade aos 80 d.a.i..

As -1,3 - glucanases estão agrupadas dentre as “Proteínas Relacionadas à Patogênese” ou Proteínas-RP. Elas são consideradas fatores de resistência após a infecção e possuem um eficiente papel na defesa das plantas. Em outras palavras, essas proteínas são induzidas em resposta à infecção por um patógeno ou a um estímulo abiótico. Essas proteínas não são necessariamente identificadas por sua ação antipatogênica e sim por seu simples acúmulo em plantas submetidas à ação de patógenos (VAN LOON, 1997). Segundo Ryals et al., (1996), o que determinará ou não a resistência ao patógeno não é apenas a produção destas proteínas, mas sim a rapidez e a intensidade com que esta reação ocorre.

Junqueira (2003) observou um aumento na atividade da enzima -1,3- glucanase em plantas de milho infectadas por fitoplasma e relacionou esta alteração com uma resposta de defesa inespecífica das plantas. Hren et al. (2009) analisaram o padrão de expressão dos genes da videira cv. 'Chardonnay' na presença do fitoplasma do amarelo e observaram um aumento na transcrição da enzima -1,3-glucanase na presença deste patógeno. Concluíram que estes resultados podem estar relacionados à liberação de subprodutos resultantes da degradação da calose para a utilização pelo fitoplasma e/ou para facilitar o movimento do patógeno através da planta. Na ausência de sintomas foliares típicos de fitoplasma houve uma insignificante expressão diferencial de genes codificando -1,3 – glucanase.

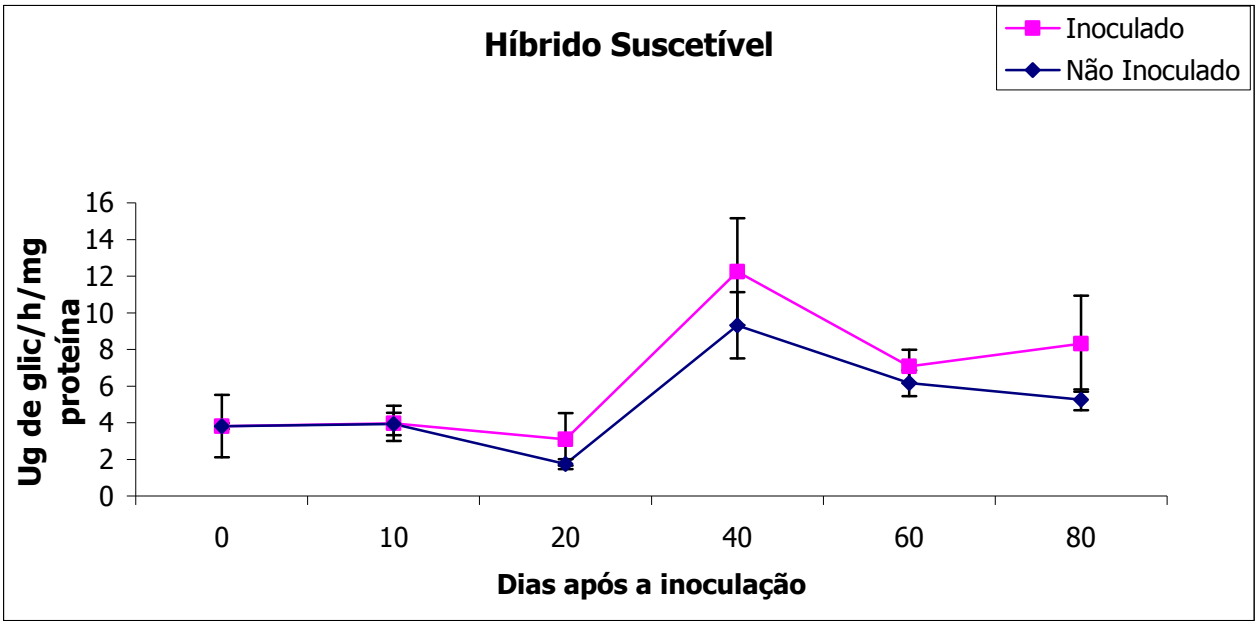

Figura 14 - Teor da atividade da -1,3-glucanase no tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido suscetível inoculado (—■—)e híbrido suscetível não inoculado (—◆—). Barras indicam a média ± erro padrão. ** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

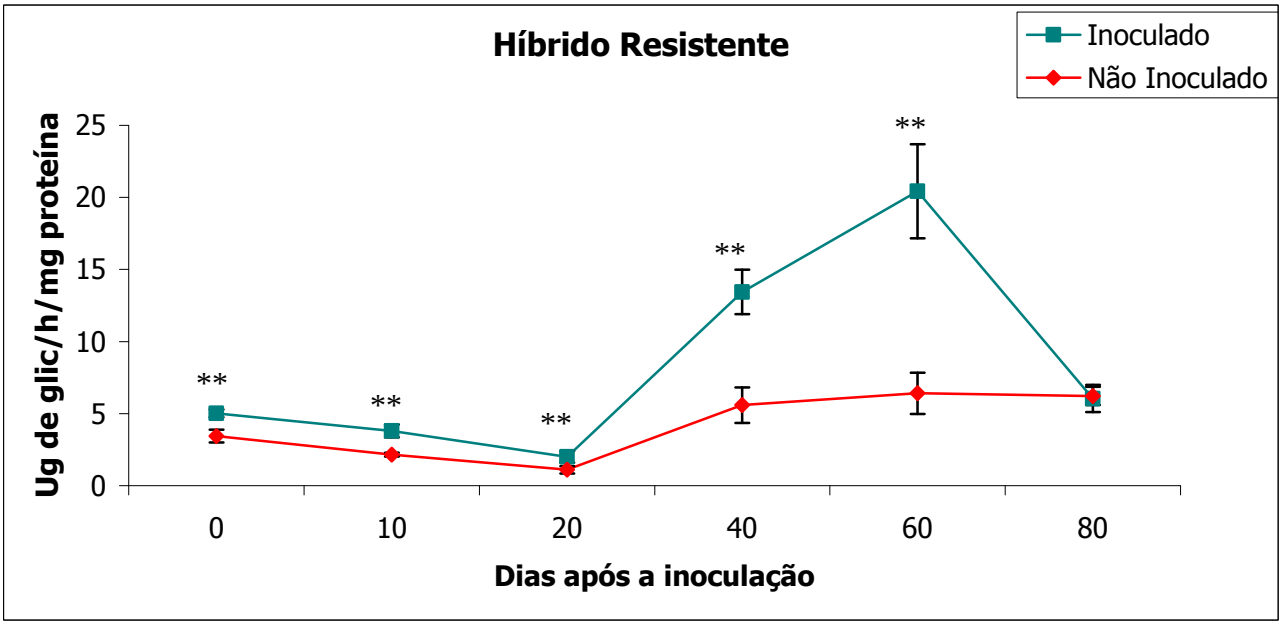

Figura 15 - Teor da atividade da -1,3-glucanase no tecido foliar do milho resultante da infecção por espiroplasma em híbrido resistente inoculado (—■—) e híbrido não resistente não inoculado (—◆—). Barras indicam a média ± erro padrão. ** Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

2.3.4 Avaliação de possíveis hospedeiros para o fitoplasma

2.3.4.1 Detecção de fitoplasma nas plantas avaliadas

Na primeira repetição, o fitoplasma foi detectado, por PCR, em todas as 5 plantas inoculadas de capim colonião; em 4 das 5 plantas de capim marmelada; e em 2 das 5 plantas de capim braquiária. Na segunda repetição, o fitoplasma foi encontrado em 2 plantas de capim colonião de um total de 10 plantas inoculadas; 2 das 10 plantas de capim marmelada; e 2 das 10 plantas de capim braquiária. A presença do patógeno nos tecidos das plantas doentes foi revelada pelo teste de PCR, pois nenhuma das plantas portadoras do fitoplasma apresentou sintomas externos da doença. A detecção do fitoplasma nas plantas de milho e nas plantas de gramíneas foi evidenciada pela visualização de bandas de aproximadamente 1,2 kb no gel de agarose, como resultado da amplificação do fragmento genômico correspondente ao 16S rDNA. Nenhuma banda foi observada nas reações de PCR onde DNA de plantas sadias de milho ou água foram usados como controles negativos. O aparecimento de bandas de 1,2 kb são típicas para fitoplasmas, quando são utilizados primers como R16 F2n/R2 na segunda reação de duplo PCR (LEE et al., 1994).

Estes resultados, baseados no PCR, mostraram que as três espécies de capins avaliados podem abrigar o agente do enfezamento vermelho do milho. Esta informação tem um relevante valor epidemiológico, pois aponta que estas gramíneas talvez possam atuar como fontes de inóculo para a cultura do milho. Os relatos de literatura registram somente espécies do gênero *Zea* como hospedeiras do fitoplasma (NAULT, 1980), no entanto, os resultados encontrados no presente trabalho permitem somar a este gênero, outros gêneros de gramíneas que também podem hospedar este agente e que se revestem de grande importância por serem usadas como pastagem. Assim, a passagem do fitoplasma a partir destas gramíneas para plantas de milho fica condicionada à existência de cigarrinhas que sejam capazes de transmitir o patógeno das plantas fontes para a cultura do milho. Desta forma, é possível que os hospedeiros alternativos possam garantir a sobrevivência do patógeno durante o período de ausência da cultura do milho e talvez atuarem como fonte de inóculo, de acordo com a hipótese levantada por Whitcomb (1989). O patossistema milho-fitoplasma do enfezamento, talvez possa se comportar de modo semelhante ao patossistena cana-fitoplasma da folha branca, no qual gramíneas são apontadas como possíveis hospedeiros alternativos do patógeno (TRAN-NGUYEN et al., 2000). Os resultados encontrados no presente estudo também confirmam os achados anteriores de Haas (2006), os quais

evidenciaram que plantas dos capins colonião, marmelada e braquiária hospedaram o agente do enfezamento vermelho em seus tecidos.

Em relação à transmissão do fitoplasma a partir das plantas fontes, pertencentes as três espécies de capins, para as plantas de milho, resultado positivo somente foi observado para uma planta de milho. Na primeira repetição, em nenhuma das 10 plantas milho inoculadas com cigarrinhas alimentadas em plantas infectadas de capim colonião, marmelada e braquiária foi constatada a presença do agente do enfezamento. Na segunda repetição, uma das 10 plantas de milho inoculadas com insetos alimentados em planta fonte de colonião mostrou a ocorrência do fitoplasma nos seus tecidos, embora não apresentasse sintomas; no entanto, resultados negativos de PCR foram encontrados para as demais plantas de milho inoculadas com insetos alimentados tanto em plantas infectadas de capim marmelada como de braquiária.

A detecção de fitoplasma em uma das plantas de milho inoculada com insetos alimentados em uma das plantas de capim colonião portadora deste patógeno tem um significado epidemiológico importante. O resultado revela que *D. maidis* é capaz tanto de inocular o fitoplasma no capim após a sua aquisição no milho, como adquirir o fitoplasma a partir da sua alimentação no capim e transmiti-lo para o milho. Esta evidência foi obtida em condições experimentais, em pequena escala, nas quais foram utilizados um reduzido número de plantas e uma pequena população do inseto vetor. Considerando as condições naturais de campo, a transmissão do agente de plantas de milho para plantas da gramínea e vice-versa poderá alcançar proporções significativas, uma vez que é reconhecida a ocorrência de altas populações da cigarrinha nas lavouras de milho e a frequente presença do capim colonião nas proximidades desta cultura. Diante da evidência obtida neste trabalho, pode-se sugerir que o capim colonião possa atuar como hospedeiro alternativo para o fitoplasma do enfezamento do milho.

Os resultados mostraram que o vetor é mais eficiente em adquirir o patógeno em plantas do milho e inoculá-lo em plantas de gramíneas do que adquirir o fitoplasma em gramíneas e inoculá-lo no milho. Isto pode ser justificado pelo fato da cigarrinha ter maior especificidade com o milho, o que lhe garante maior tempo de alimentação neste hospedeiro. Além disto, o fitoplasma é um patógeno do milho e normalmente se encontra em altas concentrações nas plantas infectadas. Assim sendo, a aquisição é feita de forma eficiente. A aquisição do fitoplasma a partir das gramíneas é dificultada, pois estas plantas não são hospedeiros preferenciais do inseto e sua sobrevivência é curta, como demonstrado no presente estudo. Além disto, a concentração

do patógeno nestas plantas é, provavelmente, baixa devido à falta de especificidade entre patógeno e hospedeiro, tornando mais difícil ao vetor encontrar o patógeno nos seus tecidos. Um caso semelhante foi relatado para o vírus do nanismo amarelo da cevada, cuja transmissão pelo inseto *Rhopalosiphon padi* só ocorre quando o patógeno se encontra em altas concentrações na planta durante o período de aquisição pelo vetor, havendo uma correlação positiva entre a duração do período de acesso à aquisição e a eficiência de transmissão do vírus (TJALLINGII; PRADO, 2001). Os fitoplasmas, apesar de colonizarem a planta de milho de modo sistêmico, podem estar distribuídos de maneira desuniforme nos tecidos e, muitas vezes, podem se encontrar presentes em baixa concentração (OLIVEIRA et al., 2002). Isto pode dificultar a aquisição por parte da cigarrinha *D. maidis*. No presente trabalho, o período de acesso à aquisição nas plantas pertencentes às 3 espécies de gramíneas foi reduzido, ficando limitado a, no máximo 2 dias, já que as ninfas não sobreviviam a períodos maiores. Esta situação pode ter provocado alguma interferência na aquisição do fitoplasma pelo vetor, tomando-se por base que um período de 4 dias tem sido recomendado para que o inseto atinja o máximo de eficiência para transmitir este patógeno.

Em relação à inoculação, devido à especificidade entre vetor e hospedeiro, a cigarrinha talvez possa alcançar seu local de alimentação mais rapidamente no seu hospedeiro preferencial e depositar o fitoplasma que a está infectando. Também, a sobrevivência maior do inseto no seu hospedeiro preferencial resulta em maior tempo de alimentação, permitindo introduzir maior quantidade de inóculo nos tecidos do hospedeiro. Em contrapartida, estes eventos ocorrem com menor eficiência em relação às outras gramíneas, provavelmente pela menor afinidade entre o inseto e as plantas.

Embora a cinética da inoculação e da aquisição de patógenos pelo vetor seja semelhante em muitos aspectos, provavelmente porque ambos estão envolvidos com processos ligados a alimentação, a aquisição parece exigir condições mais específicas do que inoculação. Uma técnica muito utilizada para avaliar o comportamento alimentar do inseto é chamada EPG (Eletrical Penetration Graphs) e tem sido demonstrada a existência de diferenças entre os dois processos. Durante a aquisição do patógeno por seu inseto vetor são produzidos padrões de onda distintos daqueles encontrados durante a inoculação (TJALLINGII; PRADO, 2001), sendo o processo de ingestão (ligado à aquisição) considerado mais complexo do que o processo de salivação (ligado à inoculação). No caso de procariotos, o processo de inoculação também parece

ser mais eficiente do que o de aquisição. Segundo Purcell (1982), a eficiência destes processos está relacionada tanto com a quantidade de inóculo adquirida durante a alimentação versus a quantidade que é "injetada" na planta, como com quantidade de inóculo necessária para infectar plantas versus aquela necessária para infectar insetos.

Para os fitoplasmas, a existência de hospedeiros alternativos tem sido relatada para agentes de diversas doenças encontradas em várias culturas. Como já referido anteriormente, um exemplo dentro das gramíneas é o caso do fitoplasma da folha branca da cana-de-açúcar que pode ser hospedado por gramíneas das espécies *Cenchrus setiger*, *Cenchrus ciliaris* e *Eragrostis falcata* (TRAN-NGUYEN et al., 2000). Ainda para cana, as gramíneas *Whiteochloa biciliata*, *Chloris inflata*, *Dactyloctenium aegyptium* e *Dactyloctenium radulans* foram reconhecidas como sendo portadoras do fitoplasma associado à doença denominada "grassy shoot", presente na Austrália (BLANCHE et al., 2003). Para culturas perenes, por exemplo, é relevante o papel de algumas plantas daninhas como hospedeiros alternativos para o agente do amarelo da videira, podendo ser relacionadas as espécies *Silene alba*, *Rubus* sp. *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Conrolrulus arvensis*, *Plantago major*, *Pieris echioides*, e *Taraxacum officinalis* (ARZONE et al., 1994). Ainda para plantas perenes, o fitoplasma agente do enrolamento clorótico da folha do damasco (*Prunus armeniaca* L.) foi detectado em diversas espécies silvestres de *Prunus* (JARAUSCH et al., 2001).

A transmissão do fitoplasma do enfezamento vermelho para plantas de capins, demonstrado neste trabalho, revela que estas gramíneas poderão ter um papel relevante na epidemiologia da doença, atuando tanto na sobrevivência do patógeno, como servindo de fonte de inóculo para a cultura do milho. Apesar de ter sido constatado em escala experimental que a cigarrinha *D. maidis* é pouco eficiente em transmitir o fitoplasma das gramíneas para o milho, em escala de campo esta transmissão pode atingir proporções significativas. Além disto, pode-se especular a existência de outros vetores existentes na natureza que possam atuar no processo de transmissão, levando o patógeno das gramíneas até o milho, sendo este posteriormente disseminado de forma eficiente na cultura pela cigarrinha *D. maidis*.

3 CONCLUSÕES

- Nenhuma das espécies botânicas avaliadas se apresentou como hospedeiro alternativo para o espiroplasma do milho.
- Capim colonião se mostrou como um hospedeiro alternativo para o fitoplasma do enfezamento vermelho.
- A presença do espiroplasma em plantas de milho provocou alterações em alguns processos metabólicos da planta: variação na concentração de proteínas solúveis, aumento na quantidade de fenóis e açúcares totais, redução na quantidade de clorofila e aumento na atividade das enzimas peroxidase e -1,3-glucanase.

REFERÊNCIAS

ABELES, F.B.; FORRENCE, L.E. Temporal and hormonal control of -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology**, New York, v. 45, p. 395-400, 1970.

ALIVIZATOS, A.S. Corn Stunt Spiroplasma in dicotyledonous plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 110, p. 148-155, 1984.

ALMEIDA, T.C. Utilização do milho e sorgo no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO MILHO E DO SORGO, 1993, Vitória. **Cultura do milho**: fatores que afetam a produtividade... Piracicaba: Potafos, 1993. p. 11-21.

ARNON, D. I. Copper enzymes in solated chloroplasts in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, New York, v. 24, p. 1-15, 1949.

ARZONE, A.; ALMA, A.; BOSCO, D.; PATETTA, A. MLO-Infected weeds in the vineyards of north-western Italy. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 143, p. 257-260, Apr.1994.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, p. 235-241, 1992.

BARROS, T.S.L.; DAVIS, R.E.; RESENDE, R.O.; DALLY, E.L. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 475-480, 2001.

BEDENDO, I.P. Micoplasmas e espiroplasmas de plantas: importância, diagnose, detecção e identificação. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 21, p. 84-85, 1995.
1997.

BERTACINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, Bologna, v. 12, p. 673-689, 2007.

BERTAMINI, M.; GRANDO, M.S.; NEDUNCHEZHIAN, N. Effects of phytoplasma infection on pigments, chlorophyll-protein complex and photosynthetic activities in field grown apple leaves. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, n.2, p. 237-242, 2003.

BERTAMINI, M.; MUTHUCHELIAN, K.; GRANDO, M.S.; NEDUNCHEZHIAN, N. Effects of phytoplasma infection on growth and photosynthesis in leaves of field grown apple (*Malus pumila* Mill. Cv. Golden Delicious. **Photosynthetica**, Praha, v. 40, n.1, p. 157-160, 2002.

BERTAMINI, M.; NEDUNCHEZHIAN, N. Effects of phytoplasma [stolbur-subgrup (Bois noir – BN)] on photosynthetic pigments, saccharides, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases, and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. **Photosynthetica**, Praha, v. 39, p. 119-122, 2001.

BIANCHINI, L. **Identificação molecular de isolados do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho coletados no Estado de São Paulo.** 2001. 44 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BLANCHE, K.R.; TRAN-NGUYEN, L.T.T.; GIBB, K.S. Detection, identification and significance of phytoplasmas in grasses in northen Australia. **Plant Pathology**, St. Paul, v.52, p.505-512, mar. 2003.

BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York , v. 72, p. 248-254, 1976.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; PINTO, N.F.J.A. **Doenças na cultura do milho**. Disponível em: < http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_83.pdf>. Acesso em 21 out. 2009.

CHOI, Y.H.; TAPIAS, E.C.; KIM, H.K.; LEFEBER, A.W.M.; ERKLENS, C.; VERHOEVEN, J.T.J.; BRZIN, J.; ZEL, J.; VERPOORTE, R. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using H-NMR Spectroscopy and multivariate data analysis. **Plant Physiology**, New York, v. 135, p. 2398-2410, Aug. 2004.

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

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

DAVIS, R.E.; WORLEY, J.F. Spiroplasma: motile, helical microorganism associated with corn stunt disease. **Phytopathology**, St Paul, v. 63, p. 403-408. Mar. 1973.

DAVIS, R.E.; WORLEY, J.F.; WHITCOMB, R.F.; ISHIJIMA, T.; STEERE, L.R. Helicoidal filaments produced by a mycoplasma-like organism associated with corn stunt disease. **Science**, Washington, v. 76, p. 521-523, May. 1972.

DENG, S.; HIRUKI, C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 14, p. 53-61, 1991.

DOI, Y.; TERANAKA, M.; YORA, K.; ASUYAMA, H. Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. **Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, v. 33, p. 259-266, 1967.

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, J.O. **Introdução e importância econômica do milho**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>. Acesso em: 21 out. 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorometric method for determination of sugars and relatedes substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, Mar, 1956.

ESTAT. Sistema de análises estatísticas do Departamento de Ciências Exatas da UNESP. Jaboticabal, 1994. 1 CD-ROM.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2009**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2009. p. 385-406.

FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E.; ARMAS, R.; RODRÍGUEZ, C.W.; MARTÍNEZ, M.; PIÑON, D.; ACEVEDO, R.; SOLAS, M.T. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 1027-1036, 2003.

GÁMEZ, R. A new leafhopper-borne virus of corn in Central America. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.53, p.929–932.1969.

GÁMEZ, R; FUJUOKA, T.; KOZUKA, Y. Purification of isometric particles from maize plants infected with rayado fino virus. **Revista de Biologıa Tropical,** San José, v. 25, p. 151–157. 1977.

GREEN, M.J.; THOMPSON, D.A.; MacKENZIE, D.J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. **Plant Disease**, St Paul, v. 83, p. 482-485, 1999.

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

GUSSIE, J.S.; FLETCHER, J.; CLAYPOOL, P.L. Movement and multiplication of *Spiroplasma kunkelli* in corn. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 10, p. 1093-1098, 1995.

HAAS, I.C.R. **Gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho.** 2005. 38p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

HAMMERSCHMIDT, R.; NICHOLSON, R.L. Resistance of maize to anthracnose:changes in host phenols and pigments. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 251-258, 1977.

HAMMERSCHMIDT, T.R.; NUCKLES, E.M.; KUC, J. Association of enhance peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to Colletotrichum lagenarium. **Physiological Plant Pathology**, London, v.20, p. 62-71, 1982.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HREN, M.; NIKOLIC, P.; ROTTER, A.; BLEJEC, A.; TERRIER, N.; RAVNIKAR, M.; DERMASTIA, M.; GRUDEN, K. 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. **BMC Genomics**, London, n. 10, p. 1-17, 2009.

JARAUSCH, W.; JARAUSCH-WEHRHEIM, B.; DANET, J.L.; BROQUAIRE, F.; DOSBA, F.; SAILLARD, C.; GARNIER, M. Detection and identification of european stone fruit yellow and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll – afected orchards in southern France. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 209-217, 2001.

JUNQUEIRA, A.C.B. **Alterações bioquímicas em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho**. 2003. 75p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

KITAJIMA, E.W. Enfermidades de plantas associadas a organismos do tipo micoplasma. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 153-174, 1994.

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**. 2007.140p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

KUNKEL, L.O. Leafhopper transmission of corn stunt, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 32, p. 246-247, 1946.

LEE, I.-M.; DAVIS, R.E.; GUNDERESEN-RINDAL, D.E. Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Oxford, v. 54, p. 221-255, 2000.

LEE, I.-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; DAVIES, R.E.; BARTOSZYK, I.M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Oxford, v. 48, p. 1153-1169, 1998.

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

LEE, I.-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E.; BOTTNER, K.D.; MARCONE, C.; SEEMÜLLER, E. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1037-1048, 2004.

LEGRAND, A.I.; POWER, A.G. Inoculation and acquisition of maize bushy stunt mycoplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals of applied biology**, Cambridge, p. 115-122, 1994.

LEITE, B; PASCHOLATI, S.F. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo: Ceres, 1995. cap. 22, p. 417-453.

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

LEPKA, M.; STITT, M.; MOLL, E.; SEEMULLER, E. Effect of phytoplasma infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 1, p. 59-68, 1999.

MADDEN, L.V.; NAULT, L.R. Differential pathogenicity of corn stunting mollicutes to leafhopper vectors in *Dalbulus* and *Baldulus* species. **Phytopathology**, St Paul, v. 73, n. 12, p. 1608-1614, 1983.

MASSOLA JÚNIOR, N. S. Enfezamentos vermelho e pálido: Doenças em milho causadas por molicutes. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 237-243, 2001.

MAUST, B. E.; ESPADAS, F.; TALAVERNA, C.; AGUILAR, M.; SANTAMARIA, J.M.; OROPEZA, C. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma, **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 8, p. 976-981, 2003.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOYA-RAYGOZA, G.; PALOMERA-AVALOS, V.; GALAVIZ-MEJIA, C. Field overwintering biology of *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) and its vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). **Annals of applied biology**, Cambridge, v. 151, n. 3, p. 373-379, 2007.

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

MUSETTI, R.; TOPPI, L. S.; ERMACORA, P.; FAVALI, M.A. Recovery in apple trees infected with apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. **Phytopathology**, St. Paul, v.94, n.2, p.203-208, 2004.

MUSETTI, R.; TOPPI, L. S.; MARTINI, M.; FERRINI, F.; LOSCHI, A.; FAVALI, M.A.; OSLER, R. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 112, p. 53-61, 2005.

NAULT, L.R. Maize bushy stunt and Corn Stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, p. 659-662, 1980.

NAULT, L. R.; DeLONG, D.M. Evidence for co-evolution of leafhoppers in the genus *Dalbulus* (Cicadellidae: Homoptera) with maize and ancestors. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 73, p. 349-353, 1980.

NERONI, R.C. **Amarelos da videira: identificação e análise fitoplasmas, transmissão dos agentes causais e otimização da diagnose filogenética**. 2009. 96 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

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

OLIVEIRA, C.M. **Variação genética entre populações de Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemíptera: Cicadellidae) e mecanismos de sobrevivência na entressafra do milho.** 2000. 167p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M.; SOUZA, I.R.P.; MAGALHÃES, P.C.; CRUZ, I. Enfezamentos em milho: expressão de sintomas foliares, detecção de molicutes e interações com genótipos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 53-62, 2002.

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R.O.; GIMENÉZ-PECCI, M.P.; LAGUNA,I.G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por molicutes em milho no Paraná, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 19-25, 2003.

OLIVEIRA, E.; SANTOS, J.C.; MAGALHÃES, P.C.; CRUZ, I. Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affected by spiroplasma acquisition and environmental conditions. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 229-230, 2007.

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo: Ceres, 1995. cap. 22, p. 342-364.

PIÑON, D.; ACEVEDO, R.; SOLAS, M.T.; FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Ultrastructural modifications of sugarcane leaves of plants suffering the yellow leaf syndrome**.** In: INTER AMERICAN CONGRESS OF ELECTRON MICROSCOPY, 8., 2005, Havana. **Resumos…** Disponível em : <http://www.ciasem.com/PSD/Havana%202005/Abstracts_Post_Biol/Dolores_Pinon.pdf>. Acesso em: 11 out. 2009.

PITRE, H.N. Greenhouse studies of the host range of *Dalbulus maidis*, a vector of corn stunt virus. **Journal of Economic Entomology,** College Park, v. 60, n. 2, p. 417-421, Apr, 1967.

PURCELL, A.H. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens.**Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 20, p. 397-417, 1982.

RODRIGUES, F.A.; JURICK II, W.M.; DATNOFF, L.E.; JONES, J.B.; ROLLINS, J.A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, p. 144-159, 2005.

ROSENKRANZ, E. Corn stunt agent isolated from sorghum. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, p. 1311, 1970. Abstract.

RYALS, J.; NEUENSCHWANDER, U.; WILLITS, M.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y.; HUNT, M. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1808-1819, oct 1996.

SALGADO, P.R. **Compostos fenólicos relacionados à resistência do cafeeiro ao bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*).** 2009. 109 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SBALCHEIRO, C.C.; DENARDIN, N.D.; BRAMMER, S.P. Alterações de isoenzimas peroxidases em plantas de feijoeiro tratadas com biocontrolador do crestamento bacteriano comum. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 29-37, 2009.

SCHNEIDER, H. Indicator host for pear decline: sintomatology, histopathology, and distribution of mycoplasmalike organisms in leaf veins. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 592-601, 1977.

SHADLE, G.L.; WESLEY, S.V.; KORTH, K.L.; CHEN, F.; LAMB, C.; DIXON, R.A. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanina ammonia-lyase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 64, p. 153-161, 2003.

SHURTLEFF, M.C. Mycoplasmas diseases. In:_____ **Compendium of corn disease**. St. Paul:American Phytopathological Society, 1980. p. 11-12.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases—an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, n. 3, Feb, 1993.

SILVA, R. G.; GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; OLIVEIRA, E. Identificação dos níveis e fontes de resistência aos enfezamentos do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 3, p. 18-29, 2002.

SILVA, R.G.; GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V.; OLIVEIRA, E. Controle genético da resistência aos enfezamentos do milho **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 921-928. ago, 2003.

SMART, C.D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C.L.; GUERRA, L.J.; HARRISON, N.A.; AHRENS, U.; LORENZ, K.-H.; SEEMÜLLER, E.; KIRKPATRICK, B.C. Phytoplasm-especific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2988-2993, 1996.

SOUZA, I.R.P.; OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M.; PRATES, H.T.; COIMBRA, R.; LOPES, J.C. Relação entre características bioquímicas e agronômicas e o enfezamento pálido. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 2, n. 1, p. 9-19, 2003.

TJALLLINGII, W.F.; PRADO, E. Analysis of circulative transmission by electrical penetration graphs. In: HARRIS, K.F.; SMITH, O.P.; DUFUS, J.E. **Virus insect-plant interactions**. San Diego: Academic Press, 2001. chap.4, p. 69-86.

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.

TRAN-NGUYEN, L.; BLANCHE, K.R.; EGAN, B.; GIBB, K.S. Diversity of phytoplasmas in northern Australia sugarcane and other grasses. **Plant Pathology**, St. Paul, v. 49, p. 666-679, Jun. 2000.

TRIPLEHORN, B.W.; NAULT, L.R. Phylogenetic classification of the genus Dalbulus (Homoptera: Cicadellidae) and notes on the phylogeny of the Macrostelini. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 78, p. 291-315.May 1985.

TSAI, J.H. Bionomics of *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), a vector of mollicutes and virus (Homoptera: Cicadellidae). In: MARAMOROSCH, S.P.; RAYCHAUDHURI, S.P. (Ed.). **Mycoplasma disease of crops:** basic and applied aspects. New York: Spring-Verlag, 1988. p. 209-221.

TSAI, J.H.; FALK, B.W. Tropical maize pathogens and their associated insect vectors. **Advances in Disease Vector Research**, New York, v. 5, p. 177-201, 1988.

TSAI, J.H.; MILLER. J.W. Corn stunt spiroplasma. **Plant Pathology Circular**, Florida, n. 373, set/out 1995. Disponível em:<http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/pathology/pathcirc/pp373.pdf> Acesso em: 17 jul.2009.

VAN LOON. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 753-765, 1997.

WAQUIL, J.M. Amostragem e abundância de cigarrinhas e danos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) em plântulas de milho. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 26, n. 3, p. 27-33, 1997.

WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A.; CRUZ, I.; SANTOS, J.P. Aspectos da biologia da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 413-420, set, 1999.

WHITCOMB, R.F. *Spiroplasma kunkelli*: biology and ecology In: WHITCOMB R.F.; TULLY, J.G. **The mycoplasmas V:** spiroplasmas, acholeplasmas, and mycoplasmas of plant and arthropods. San Diego: Academic Press, 1989. chap. 10, p. 488-533.