

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

**Gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiros alternativos para o
fitoplasma do enfezamento vermelho do milho**

Isolda Cristina Ruschel Haas

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de concentração:
Fitopatologia**

**Piracicaba
2005**

Isolda Cristina Ruschel Haas
Engenheiro Agrônomo

**Gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do
enfazamento vermelho do milho**

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Agronomia, Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2005**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Haas, Isolda Cristina Ruschel

Gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do
enfazamento vermelho do milho / Isolda Cristina Ruschel Haas. - - Piracicaba, 2005.
38 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

1. Cigarrinha-vetora-de-doença 2. Enfazamento vermelho 3. Fitoplasma 4. Gramínea
forrageira 5. Interação planta-patógeno-vetor 6. Milho 7. Planta daninha I. Título

CDD 633.15

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

“Tudo vale a pena
quando a alma não é pequena
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor
Deus ao mar o perigo e o abismo deu
Mas foi nele que espelhou o céu”
Fernando Pessoa

A Deus
OFEREÇO

Aos meus pais José e Rosângela,
minhas irmãs Paula e Luciana
e aos meus avós Lory e Sírio
pelo amor, incentivo e constante apoio durante toda minha vida

DEDICO

Agradecimentos

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan Paulo, pela preciosa orientação, pela amizade, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, pelas valiosas contribuições ao trabalho e amizade;

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida para a realização desta pesquisa;

Ao prof. Dr. Sérgio F. Pascholati, pelos ensinamentos transmitidos e revisão do Abstract;

Ao demais professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ, pelos ensinamentos transmitidos;

Aos amigos do Lab. de Procariotos Fitopatogênicos, Ana Paula, Alan, Daniela, Eliane, Luiz Fernando, Raquel e Samuel, pelo bom convívio, amizade e espírito solícito no desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos do Lab. de Vetores do setor de Entomologia da ESALQ, Alexandre, Carla, Daniele, Eduardo, Érica, Fernanda, Marcelo e Rodrigo, pela amizade, respeito e espírito solícito no desenvolvimento deste trabalho;

Ao funcionário do Setor de Fitopatologia Edivaldo Buriolla, pela presteza no auxílio solicitado;

A funcionária do Lab. de Vetores Maria Tereza Lopes pela amizade, e apoio constante;

Ao Eng. Agr. Rock Seille Christiano pela amizade e auxílio nas análises estatísticas;

Aos meus amigos Alejandro, Denise, Estela, Fabrício, Maria Cândida e Marisa pelos bons momentos passados juntos;

Ao Flávio Higa, pelo carinho e auxílio ao escrever o Abstract;

A demais amigos do departamento de Fitopatologia, pelo agradável convívio, companheirismo e amizade;

A todas as pessoas que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 DESENVOLVIMENTO.....	9
2.1 Revisão de literatura	9
2.1.1 Importância da cultura do milho	9
2.1.2 Consequências epidemiológicas do "milho safrinha"	9
2.1.3 Enfezamento do milho.....	10
2.1.4 Sintomatologia	11
2.1.5 Diagnose.....	12
2.1.6 Transmissão através de <i>Dalbulus maidis</i>	12
2.1.7 Controle	14
2.1.8 Plantas hospedeiras	14
2.2 Material e métodos	17
2.2.1 Espécies de plantas testadas como hospedeiras alternativos	17
2.2.2 Obtenção da população sadia e infectiva do vetor.....	17
2.2.3 Inoculação experimental das plantas com fitoplasma.....	18
2.2.4 Extração de DNA e condições de PCR e eletroforese.....	18
2.2.5 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP	20
2.2.6 Sobrevivência da cigarrinha nas espécies de forrageiras e ervas daninhas	21
2.3 Resultados e Discussão	22
2.3.1 Detecção de fitoplasma em plantas inoculadas	22
2.4.3 Identificação de fitoplasma através da análise de RFLP	26
2.3.4 Sobrevivência da cigarrinha vetora nas <i>sp</i> de forrageiras e ervas daninhas	28
3 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33

RESUMO

Gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho

O enfezamento vermelho, causado por um fitoplasma, foi registrado no Brasil no início da década de setenta, sendo relatado como de pequena importância para a cultura do milho. A partir de meados dos anos oitenta, com a introdução dos plantios de safrinha e dos cultivos irrigados, a doença passou a ser considerada de relevância econômica. Atualmente, o enfezamento se constitui em uma das mais importantes doenças do milho, sendo, inclusive, fator limitante para produção em função da região, do híbrido escolhido e da época de plantio. Um ponto crítico no manejo da doença se refere ao escasso conhecimento sobre a sobrevivência do patógeno e do inseto vetor (*Dalbulus maidis*) durante a ausência da cultura do milho no campo. Este tipo de informação pode ser útil principalmente na redução do inóculo inicial do patógeno, visando um controle mais eficiente da doença. Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar algumas gramíneas, usadas na formação de pastagens, e espécies daninhas, que ocorrem na cultura do milho, como potenciais hospedeiros alternativos do fitoplasma e do seu vetor. Treze espécies de capins e ervas daninhas foram experimentalmente inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho, através de cigarrinhas infectivas. Avaliações foram feitas com base na observação de sintomas, na detecção molecular do fitoplasma nos tecidos das plantas inoculadas e na contagem de insetos sobreviventes nestas plantas inoculadas. A detecção foi feita por duplo PCR e a identificação do fitoplasma foi realizada pela análise de RFLP, com as enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *KpnI* e *MboI*. Das treze espécies testadas, o fitoplasma foi encontrado nos capins colônia (*Panicum maximum*), marmelada (*Brachiaria plantaginea*) e braquiária (*Brachiaria decumbens*), através da amplificação do 16S rDNA, visualizado em gel de agarose na forma de bandas. Os insetos sobreviveram nos três capins até o final do período de experimentação, revelando que os capins foram capazes de abrigar a cigarrinha. Estes resultados demonstraram a possibilidade destas espécies atuarem como potenciais hospedeiros alternativos para o patógeno e o seu vetor, em condições naturais. Estas informações poderão contribuir para novas investigações, na busca de melhor conhecimento sobre a epidemiologia da doença, principalmente quanto à sobrevivência do fitoplasma e da cigarrinha vetora.

Palavras-chave: enfezamento vermelho do milho, *Dalbulus maidis*, plantas hospedeiras

ABSTRACT

Grasses as potential alternative hosts for the maize bushy stunt phytoplasma

Maize bushy stunt, caused by a phytoplasma, was reported in Brazil in the beginning of the seventies, and it was considered as not important for corn. Since the middle of the eighties decade, when the later planting practice and irrigation were adopted, the disease became relevant. Currently, maize bushy stunt represents one of the most important diseases and has caused significant losses. In some conditions the disease can limit the production, especially in relation to the region, used hybrids and crop season. A critical point to disease control is the lack of about survival of pathogen and vector, during the absence of corn crop on the field. This kind of information can be useful to promote the reduction of the initial inoculum, aiming a more efficient disease control. Thus, the objective of the present study was to evaluate some grasses and weeds species as potential alternative hosts of the maize bushy stunt phytoplasma and its vector *Dalbulus maidis*. Thirteen botanical species were experimentally inoculated with the phytoplasma by using infective leafhoppers. Evaluations were based upon symptom observation, molecular detection of the phytoplasma in tissue of inoculated plants and the of number of insects present in the plants. Detection was conducted by nested PCR and phytoplasma identification by RFLP analyses, using *AluI*, *RsaI*, *KpnI* and *MboI* as restriction enzymes. Phytoplasma was detected in three species, *Panicum maximum*, *Brachiaria plantaginea* and *Brachiaria decumbens* based on amplification of 16S rDNA, visualized as specific band in agarose gel. Insects remain on alive on the plants belonging to those three species up to the end of the assays. Thus, the present study showed the possibility of those species as potential alternative hosts to the pathogen and its vector, under natural conditions. The results can contribute for new investigations, in order to understanding the epidemiology of the disease, especially in relation to phytoplasma and vector survival.

Keywords: maize bushy stunt phytoplasma, *Dalbulus maidis*, host plants

1 INTRODUÇÃO

O aumento da área cultivada com milho e a redução da sazonalidade de seu cultivo têm alterado a importância relativa das pragas e doenças na cultura, principalmente nas regiões Sudeste e Centro Oeste do Brasil. As doenças cujos patógenos são transmitidos por insetos, entre elas o enfezamento vermelho do milho, assumiram especial importância, ocorrendo em altos níveis, em plantios comerciais realizados com diversos híbridos. As altas incidências têm resultado em perdas significativas na produção, tanto para as culturas instaladas em épocas normais de plantio como para aquelas realizadas mais tardiamente, conhecidas como ‘safrinha’. A cigarrinha *Dalbulus maidis* é o principal inseto vetor do fitoplasma do enfezamento vermelho. Esta espécie tem sido citada como a única representante do gênero *Dalbulus* no Brasil, sendo uma das espécies predominantes que ocorrem na cultura do milho. Como plantas hospedeiras de *D. maidis* têm sido citadas, além do milho, as espécies tripsacum (*Tripsacum dactyloides*) e teosinto (*Euchlaena mexicana*). Entretanto, em experimentos de campo, adultos e ovos de *D. maidis* têm sido encontrados em plantas de sorgo, sugerindo a existência de biótipos do inseto. Em relação ao fitoplasma do milho, sua gama de hospedeiros é muito pouco conhecida e alguns relatos indicam uma grande especificidade tanto do patógeno quanto do vetor. No entanto, tem sido considerada a hipótese da ocorrência de outros hospedeiros alternativos na natureza, pois o patógeno sobrevive entre as estações de cultivo do milho.

Estudos epidemiológicos sobre essa doença no Brasil são escassos. Assim, os mecanismos envolvidos na manutenção de populações das cigarrinhas vetoras, bem como a sobrevivência do inóculo inicial de fitoplasma nos períodos em que a cultura do milho não está no campo são fatores ainda pouco conhecidos. Neste contexto, possíveis hospedeiros alternativos do fitoplasma, poderiam favorecer sua sobrevivência e, ao mesmo tempo, atuarem como fonte de inóculo, desempenhando um importante papel na epidemiologia da doença.

Em razão da importância da doença para a cultura do milho e do interesse em se conhecer melhor a dinâmica da interação planta-patógeno-vetor, o presente trabalho teve como objetivos avaliar algumas espécies de gramíneas usadas em pastagens e algumas espécies de plantas daninhas como potenciais hospedeiras alternativas do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho, bem como investigar a sobrevivência da cigarrinha vetora *D. maidis* nestas mesmas espécies.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 Importância da cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo, juntamente com o trigo e o arroz. O Brasil está entre os cinco maiores produtores mundiais, respondendo pela produção de 40 milhões de toneladas (FNP, 2005).

Dentre os produtos agrícolas brasileiros, o milho é um dos mais expressivos economicamente, constituindo-se em um dos principais insumos para o segmento produtivo, sendo utilizado direta e indiretamente na alimentação humana. A cultura encontra-se amplamente distribuída no país e vem mostrando aumentos, tanto na produtividade quanto na área cultivada, na safra normal e nas épocas não tradicionais de plantio, esta última conhecida como segunda safra ou “milho safrinha” (FNP, 2005). A implementação da prática de “safrinha” aliada à adoção de irrigação têm proporcionado a presença da cultura no campo durante o ano todo, em determinadas regiões. Este sistema de produção tornou-se economicamente relevante para a cultura, sendo praticado rotineiramente em vastas áreas dos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (GARCIA, 1997).

A cultura do milho ocupa, atualmente, a maior extensão de área de plantio entre todas as lavouras do Brasil, oscilando em torno de 12 milhões de hectares (FNP, 2005). Nessa significativa área incluem-se as áreas de milho pipoca, milho verde e milho para silagem.

2.1.2 Conseqüências epidemiológicas do “milho safrinha”

Do ponto de vista epidemiológico, o cultivo do milho safrinha, pela extensão de sua área, determinou uma alteração profunda e imprevisível no comportamento das doenças que ocorrem na cultura. Doenças como viroses e o complexo do enfezamento tiveram sua importância evidenciada, pois a população de insetos vetores, como pulgões e cigarrinhas, tem aumentado de forma marcante, devido à disponibilidade de hospedeiro durante quase todo o ano (OLIVEIRA et al., 1998). Além disso, Lopes e Oliveira (2004 apud OLIVEIRA, 2002) demonstraram que os níveis de incidência de enfezamentos, tanto o enfezamento vermelho como o pálido, foram mais altos nos plantios de safrinha, em relação aos plantios safra de verão, para os estados de Minas Gerais e Goiás.

Epidemiologicamente, as plantas voluntárias e a cultura de milho safrinha se constituem numa ponte verde entre plantios sucessivos do milho, favorecendo a manutenção tanto do inóculo do patógeno como da população do vetor.

2.1.3 Enfezamento do milho

O enfezamento do milho foi descrito, pela primeira vez, no vale do Rio Grande no estado Norte Americano do Texas, na década de 40 (ALTSTATT, 1945). Inicialmente, esta doença foi atribuída a um vírus. Mais tarde, na década de setenta (NAULT, 1980), foi demonstrado que um fitoplasma era o agente do enfezamento vermelho do milho (“maize bushy stunt”) e que um espiroplasma era o patógeno causador do enfezamento pálido (“corn stunt”).

Fitoplasmas são organismos procariotos, sem parede celular, possuindo somente uma membrana unitária envolvendo o citoplasma. São habitantes de floema e transmitidos, na natureza, por insetos vetores do tipo cigarrinhas. Embora exaustivos estudos tenham sido conduzidos, não se obteve sucesso em cultivar estes microrganismos em meios de cultura. Assim sendo, os clássicos postulados de Koch não foram fechados para este tipo de patógeno, no entanto, irrefutáveis evidências demonstraram a atuação destes procariotos como agentes causais de doenças em plantas. (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 1997; DAVIS, 1995).

No Brasil, ambas as formas de enfezamento são conhecidas desde o início da década de 70 (COSTA; KITAJIMA; ARRUDA, 1971), quando eram consideradas de importância secundária. Entretanto, já naquela época alertava-se que poderiam causar sérios prejuízos, caso o milho fosse plantado tardiamente. Essa tendência em causar maiores danos em plantios tardios já havia sido verificada por Altstatt (1945) desde a primeira descrição feita por este autor. Os enfezamentos têm causado epidemias em diversos países, como Estados Unidos (BRADFUTE; TSAI; GORDON, 1981) Argentina (LENARDON et al., 1993; PECCI et al., 2002), Nicarágua (HRUSKA et al., 1996) e Brasil (OLIVEIRA et al., 1998).

A partir de meados da década de 80, os enfezamentos manifestaram sua capacidade de destruição para a cultura do milho no Brasil. Inicialmente, seus danos foram assinalados nas chamadas culturas de safrinha. Esta prática levou à ocorrência de epidemias pelo fato do milho ser cultivado numa época em que as condições favorecem o aumento da população da cigarrinha vetora, cujo pico populacional tem sido registrado nos meses de março/abril, coincidentemente com a fase de crescimento do milho. Nestas condições, a incidência tem sido alta, podendo

provocar perdas significativas de produção, principalmente em função dos locais onde a cultura está instalada e das variedades ou híbridos escolhidos para o plantio (MASSOLA, 1998). Este quadro, anteriormente restrito ao milho safrinha, evoluiu para os plantios tradicionais realizados em outubro/novembro, tendo sido relatada altas incidências em culturas instaladas neste período. Em condições naturais, foram registradas incidências médias de 65,3% a 100% para o enfezamento do milho, resultando em produções baixas para alguns campos e nulas para outros (OLIVEIRA et al., 1998).

Trabalhos conduzidos em condições controladas demonstraram que o enfezamento vermelho provocou uma redução da produção variando de 52,5 a 72,5 %, menor tamanho de espigas, ocorrência de grande proporção de grãos miúdos e uma redução significativa no número de grãos por planta (TOFFANELI, 2001). Ainda, foi constatado que a severidade dos sintomas e os níveis de dano foram diretamente proporcionais ao número crescente de insetos infectivos presentes nas plantas. Massola et al. (1999) obtiveram correlações positivas entre danos e incidência de enfezamentos, sendo verificado que para cada 1% de aumento na incidência da doença, ocorreu uma redução de 0,8 % na produção de grãos. Estes autores também observaram que quanto mais cedo ocorreu a infecção, maiores foram os danos, atingindo valores de até 50-60% na redução de produção de grãos.

Atualmente, ambos os enfezamentos estão sendo considerados como importantes doenças do milho, tanto devido às perdas constantes que vem causando, como por se constituírem em fatores limitantes para a produção, em função da região, da variedade ou híbrido escolhidos e da época de plantio. As doenças têm sido constatadas em diversas regiões produtoras localizadas nos Estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Goiás (GARCIA, 1997). No estado do Paraná no ano de 2000, a perda causada pelo complexo do enfezamento (enfezamento vermelho, enfezamento pálido e vírus rayado do milho) em plantio safrinha foi estimada em 16,5 milhões de dólares (OLIVEIRA et al., 2003).

2.1.4 Sintomatologia

Os sintomas exibidos por plantas infectadas pelo fitoplasma são variáveis de acordo com o híbrido ou variedade de milho (BEDENDO, 1995). Inicialmente, os sintomas se manifestam por clorose dos bordos das folhas, seguida por avermelhamento destas áreas cloróticas. O avermelhamento pode evoluir para o restante da lâmina foliar, com a idade da folha. Algumas

vezes, os bordos foliares podem se apresentar rasgados e as folhas torcidas e de tamanho reduzido. Os colmos se mostram mais finos e os entre-nós apresentam encurtamento, inclusive interferindo com o tamanho do pendão floral. Numerosas espigas podem se formar em cada planta, porém estas espigas são de tamanho reduzido e praticamente não produzem grãos. Embora não seja comum, vários perfilhos podem aparecer nas axilas das folhas e, principalmente, na base das plantas.

2.1.5 Diagnose

Desde a descoberta dos fitoplasmas, a diagnose das doenças associadas a estes agentes têm sido feita por meio de sintomas típicos, com subsequente observação de tecido vegetal em microscópio eletrônico e aplicação de testes biológicos e moleculares (LEE et al., 2000). Dentre estes testes estão incluídos gama de hospedeiros, diversidade de insetos vetores e remissão de sintomas com o uso de antibióticos do grupo da tetraciclina.

A microscopia eletrônica de transmissão sido muito útil na detecção desses patógenos em plantas suspeitas de infecção, através da visualização de corpúsculos pleomórficos presentes nos vasos de floema (KITAJIMA; NAZARENO, 1985). No entanto, com o desenvolvimento da biotecnologia, as técnicas moleculares envolvendo amplificações de determinadas fragmentos genômicos têm sido empregadas com frequência cada vez maior para demonstrar a associação entre fitoplasmas e plantas doentes (BEDENDO; DAVIES; DALLY, 2000; DAVIS; LEE, 1993; HARRISON et al., 1996; LEE et al., 1993). Entre estas técnicas destaca-se o PCR (Polymerase Chain Reaction), com o emprego de iniciadores específicos para fitoplasmas, visando principalmente a amplificação da região correspondente ao 16SrDNA.

A identificação de fitoplasmas também tem sido feita com o emprego de técnica molecular, sendo a análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) aquela mais adotada para esta finalidade (LEE et al., 1998). De acordo com a atual classificação aceita para fitoplasmas, o agente do enfezamento vermelho do milho está classificado no grupo 16SrI, subgrupo B (LEE et al., 2004).

2.1.6 Transmissão através de *Dalbulus maidis*

Cigarrinhas do gênero *Dalbulus*, entre elas, *D. maidis*, *D. eliminatus* e *D. gelbus* atuam como vetoras do fitoplasma, sendo *D. maidis* (*Dalbulus maidis* DeLong & Wolcott) a principal espécie vetora nas condições naturais (NAULT, 1980).

A espécie *D. maidis* é citada como a única representante do gênero *Dalbulus* no Brasil, sendo encontrada, de forma freqüente, principalmente, no cartucho de plantas de milho (WAQUIL, 1997). Quando a população é muito alta, esses insetos podem ocasionar seca e morte das plantas jovens. Isto decorre da intensa sucção da seiva e da grande quantidade de ovos depositada no limbo foliar ou ainda, pela ação tóxica da sua saliva e/ou devido à excreção açucarada, que propicia o desenvolvimento de fungos sobre as folhas. Redução de cerca de 40% no peso da parte aérea e de 62% na parte subterrânea foram registradas em plântulas de milho, devido à alimentação de *D. maidis* (WAQUIL, 1997). Estudos têm mostrado que a migração e dispersão são importantes estratégias para a sobrevivência da cigarrinha durante a entressafra do milho (OLIVEIRA, 2000).

A transmissão do patógeno do enfezamento vermelho pela cigarrinha-do-milho é feita de maneira persistente propagativa (NAULT, 1980). Este tipo de relação entre o patógeno e o vetor é, geralmente, caracterizado pela existência de períodos bem definidos envolvendo esta associação. Assim, o período de aquisição é definido como o tempo necessário para que o vetor adquira o patógeno, ao se alimentar numa planta infectada; o período de incubação ou de latência é o tempo necessário para que o patógeno colonize os tecidos internos do vetor, até atingir as glândulas salivares, quando o inseto estará apto a transmiti-lo; o período de retenção se refere ao tempo em que o inseto permanece capaz de transmitir o patógeno (NAULT, 1997; OLIVEIRA et al., 2004).

No caso da associação entre o fitoplasma e a cigarrinha *D. maidis*, os períodos de aquisição, incubação e inoculação, variam, respectivamente, de 4 a 7 dias, 13 a 24 dias e 2 a 7 dias. O período de retenção é bastante longo, sendo que o inseto normalmente transmite o patógeno por toda a vida.

Como plantas hospedeiras de *D. maidis* têm sido relatadas muito poucas espécies, tais como milho (*Zea mays*), tripsacum (*Tripsacum dactiloides*) e teosinto (*Euchlaena mexicana*) (TSAI, 1988). No campo, Ebbert e Nault (2001) sugerem que tanto a planta de milho como a cigarrinha *D. maidis* se comportam como hospedeiros especializados do patógeno. No campo,

adultos e ovos de *D. maidis* têm sido encontrados em plantas de sorgo (WAQUIL, 1997), entretanto, se observou baixa incidência de ovos e sobrevivência de adultos no sorgo, parecendo não ser um hospedeiro adequado para essa espécie de inseto.

2.1.7 Controle

O uso de genótipos resistentes e tolerantes é a prática mais indicada para o controle da doença, no entanto existem algumas medidas alternativas que podem contribuir para a diminuição dos danos. Entre estas medidas podem ser citadas o uso adequado de nitrogênio, densidade de plantio e mesmo o emprego de outras culturas em consórcio com o milho. Estas medidas baseiam-se na hipótese de que, o nível de nitrogênio, a densidade de plantio e a presença de uma cultura intercalar modificam o ambiente de cultivo, influenciando na abundância, na atividade e no movimento dos insetos vetores. Conseqüentemente, a dispersão do patógeno veiculado por *D.maidis* também seria influenciada. Entretanto, os poucos estudos realizados com a finalidade de investigar esta hipótese não tem mostrado efeitos pronunciados na redução de incidência do enfezamento (CASTRO et al., 1992). O controle químico do vetor pelo uso de inseticida, visando reduzir a dispersão do patógeno, parece não ser eficiente devido a grande mobilidade de *D.maidis* no campo e sua eficiência na transmissão do patógeno (TOFFANELLI, 2001).

2.1.8 Plantas hospedeiras

Muitas espécies daninhas e silvestres são hospedeiras de insetos e atuam como hospedeiras intermediárias de agentes de doença transmitidos por insetos vetores. No Brasil, trabalhos sobre a associação de plantas daninhas como hospedeiras de insetos no período da entressafra são escassos. As informações bioecológicas sobre insetos-praga após a colheita são raras. A maioria dos estudos diz respeito a sua ocorrência durante a safra das culturas.

Em relação ao fitoplasma do milho, pouco se sabe sobre a sua gama de hospedeiros, embora os relatos existentes indiquem uma grande especificidade tanto do patógeno quanto do vetor. Entretanto, Whitcomb (1989) levanta a hipótese de que pode haver outros hospedeiros alternativos na natureza, pois o patógeno sobrevive entre as estações de cultivo.

Para o fitoplasma da folha branca da cana, existem relatos (TRAN-NGUYEN et al., 2000) de que algumas espécies podem atuar como hospedeiros alternativos, dentre elas algumas gramíneas como *Cenchrus setiger*, *Cenchrus ciliaris*, *Eriachne obtusa* e *Eragrostis falcata*.

Várias espécies de plantas silvestres e daninhas também foram relatadas como hospedeiras para fitoplasmas no Brasil, como por exemplo, 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 conyzoides*, e *A. fastigiatum*), mimo-de-vênus (*Hibiscus rosa sinensis*) e crista-de-galo (*Celosia sp.*) (KITAJIMA, 1994).

Segundo Bianchi (1998), entre as plantas daninhas que infestam as áreas cultivadas com milho na primavera/verão destacam-se o leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.), picão preto, papuã (*Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc.), guanxuma, corriola (*Ipomea spp.*), balãozinho (*Cardiospermum halicacabum* L.), caruru (*Amaranthus spp.*), nabiça (*Raphanus spp.*), carrapichão (*Xanthium strumarium* L.), milhã (*Digitaria horizontalis* Wild.), capim pé-de-galinha (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.), capim carrapicho (*Cenchrus echinatus* L.) e sorgo-de-alepo (*Sorghum halepense* (L.) Pers.). Fancelli e Dourado Neto (2004) relatam as seguintes plantas daninhas frequentemente encontradas em áreas produtoras de milho: capim marmelada (*Brachiaria plantaginea*), trapoeraba (*Commelina virginica*), guanxuma, capim carrapicho (*Cenchrus echinatus*), picão-preto, capim rabo-de-raposa (*Setaria geniculata*), capim amargoso (*Digitaria insularis*), capim pé de galinha (*Eleusine indica*), picão branco (*Galinsoga parviflora*), beldroega (*Pontulaca oleraceae*), apaga-fogo (*Alternanthera tenella*), caruru (*Amaranthus hybridus*), carrapicho-de-carneiro (*Acanthospermum hispidium*), corda-de-viola (*Ipomea sp.*), capim-colchão (*Digitaria horizontalis*), capim colônia (*Panicum maximum*), amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla*), capim massambará, (*Sorghum halepense*) serralha (*Emilia sonchifolia*), carrapicho rasteiro (*Acanthospermum australe*), anileira (*Indigofera irsuta*), erva de santa luzia (*Euphorbia pilulifera*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*) fedegoso (*Cassia tora*), cheirosa (*Hyptis lophanta*), erva de santa maria (*Chenopodium ambrosioides*), tiririca (*Cyperus rotundus*), tiriricão (*Cyperus esculentus*) e leiteiro.

Powe (1987) estudou o efeito da diversidade e densidade de plantas sobre *D. maidis*, observando menor ocorrência do vetor e menor incidência da doença quando o milho esteve associado com plantas daninhas. O autor verificou que esses fatores afetaram significativamente a densidade populacional do inseto, por alterar seu padrão de movimento. Summers et al. (2004)

avaliaram a presença e sobrevivência de *D.maidis* na época de entressafra do milho e mostraram que a sobrevivência do inseto durante o inverno está associada com a alfafa, triticale, *Paspalum* sp. e algumas plantas daninhas de inverno, porém destacaram que não houve evidência destas plantas servirem como alimento para a cigarrinha.

Frizzas (1998) observou a ocorrência de *D.maidis* em apaga-fogo presente em áreas plantadas com milho e em crotalária, guanxuma e anileira em áreas cultivadas com soja. Apesar dos insetos terem sido observados em pequeno número, esta evidência é interessante, considerando que o milho é apontado como o único hospedeiro natural da cigarrinha conhecido Brasil. Estes resultados levantam a hipótese destas plantas daninhas atuarem como possíveis refúgios naturais do inseto durante a entressafra.

Plantas silvestres e/ou daninhas podem abrigar fitoplasmas de forma assintomática. Segundo Davis (2005) nos ecossistemas naturais, algumas espécies de plantas podem não exibir sintomas típicos da doença em resposta à infecção por fitoplasma. Como exemplo, plantas assintomáticas de videira silvestre (*Vitis riparia*) podem abrigar isolados de fitoplasmas que estão associados com o desenvolvimento de sintomas severos em videiras cultivadas (*V. vinifera*). Somente nos últimos anos, as plantas daninhas e silvestres têm sido avaliadas como possíveis reservatórios de fitoplasmas, com o propósito de contribuir para o entendimento de aspectos epidemiológicos relacionados a doenças causadas por estes agentes patogênicos (BERTACCINI, 2005).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Espécies de plantas testadas como hospedeiros alternativos

As seguintes espécies de capins comumente empregadas na formação de pastagens foram avaliadas como possíveis hospedeiras para o fitoplasma do enfezamento do milho e para o seu vetor: *Panicum maximum* (capim colonião), *Brachiaria decumbens* (braquiária), *Milinis minutiflora* (capim gordura), *Brachiaria plantaginea* (capim marmelada).

Além das forrageiras citadas, as seguintes ervas daninhas que normalmente ocorrem na cultura do milho foram testadas: *Cenchrus echinatus* (carrapicho), *Digitaria ciliaris* (capim colchão), *Eleusine indica* (capim pé-de-galinha), *Bidens pilosa* (picão preto), *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), *Rhaphanus* sp (nabiça), *Emilia sanchifolia* (serralha), *Rottboelia exaltata* (capim camelote) e *Digitaria insularis* (capim amargoso).

Sementes destas espécies foram pré-germinadas em papel de filtro umedecido para obtenção de uniformidade no desenvolvimento das plantas. Após esta etapa, as sementes foram semeadas em vasos de 1,5L de capacidade, contendo como substrato uma mistura de solo, areia e matéria orgânica.

2.2.2 Obtenção da população sadia e infectiva do vetor

Cigarrinhas-do-milho (*D. maidis*) foram coletadas em lavoura de milho, com o auxílio de um aspirador. Os insetos foram confinados durante quatro dias dentro de pequenas gaiolas presas às folhas de plantas saudas de milho, para efetuarem a postura em local determinado da folha, facilitando a excisão dos ovos. A cigarrinha-do-milho não transmite o fitoplasma por via transovariana, desta forma foi possível obter uma colônia de insetos saudos. Após esse período, as cigarrinhas foram removidas e as plantas foram mantidas em BOD, ajustada com temperatura de 26°C e período de 12 horas de luz / escuro. Após cinco dias de incubação, com o auxílio de microscópio estereoscópico e agulha histológica, os ovos foram retirados da superfície foliar e depositados em placas de vidro, contendo em seu interior papel de filtro umedecido em água destilada. Estes ovos foram mantidos em BOD regulado para fornecer as mesmas condições de temperatura e luminosidade já referidas anteriormente. As ninfas começaram a eclodir cerca de 2 a 3 dias após a excisão dos ovos, sendo que as ninfas de primeiro ínstar foram transferidas para plantas de milho mantidas em gaiolas de criação.

A partir de população sadia, ninfas de segundo e terceiro ínstaes de *D. maidis* foram transferidas para plantas de milho infectadas com o fitoplasma do enfezamento (plantas-fonte). O período de acesso à aquisição (PAA) do fitoplasma foi de 4 dias, sendo as ninfas posteriormente transferidas para plantas sadias de milho, nas quais permaneceram por um período de 21 dias, correspondentes ao período de latência.

2.2.3. Inoculação experimental das plantas com fitoplasma

No estágio de 3 a 4 folhas, 10 plantas de cada uma das espécie testadas foram inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho, através do confinamento de dez cigarrinhas infectivas de *D. maidis*/planta, durante um período de 4 dias. Como gaiolas para confinamento dos insetos nas plantas foram usadas garrafas plásticas de 2L. Como controle positivo, 10 plantas de milho pipoca cv. Zélia, sabidamente suscetível ao fitoplasma, foram inoculadas com indivíduos da mesma população infectiva de cigarrinhas. Após o quarto dia de confinamento, as plantas foram pulverizadas com inseticida, visando eliminação do vetor, e mantidas em casa telada. Cinco plantas das diferentes espécies, não submetidas à inoculação, foram consideradas como testemunhas (controle negativo).

As avaliações foram feitas através da observação do aparecimento de sintomas ao longo do período de duração do ensaio. Os ensaios tiveram duração média de 70 dias e, no final dos mesmos, amostras de tecido foliar foram coletadas e submetidas ao teste de PCR, visando demonstrar a presença ou ausência do fitoplasma nas plantas inoculadas e não inoculadas.

2.2.4 Extração de DNA e condições de PCR e eletroforese

Extração de DNA total

A partir das amostras foliares foi extraído o DNA total das plantas componentes dos ensaios de inoculação. O DNA obtido de plantas de milho sabidamente infectadas pelo fitoplasma do enfezamento serviu como padrão positivo para o teste de PCR.

A metodologia utilizada seguiu o protocolo de extração rápida desenvolvida pelo CIMMYT. As amostras foram pesadas, utilizando-se 2g do material fresco ou 0,3g do material seco, constituído basicamente de tecido foliar. Este material foi macerado em almofariz, usando-se nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi transferido para tubos de microcentrífuga, com capacidade de 1,5 mL, onde foi adicionado 800µL de tampão de extração (2g CTAB, 8,18g

NaCl, 0,74 g EDTA, 1,5 g Tris HCL, 100mL de água, pH 8,0). Após agitação vigorosa, as amostras foram levadas para incubação à temperatura de 60-65°C, por um período de 30-60 minutos. Durante a incubação, os tubos foram agitados a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão. Após esta etapa, foram adicionados 600 µL de CIA (24 partes de clorofórmio + 1 parte de álcool isoamílico) e a mistura foi agitada vigorosamente durante 5 minutos ou até se obter uma emulsão homogênea. O material foi centrifugado em microcentrífuga à 14.000 rpm durante 5 minutos. Os tubos foram retirados da centrífuga cuidadosamente, evitando-se perturbar a interface entre as duas fases obtidas. Foi removida a fase superior (aquosa) com micropipeta, transferindo-a para um novo tubo. À fase aquosa obtida, foi adicionado igual volume de isopropanol gelado (-20°C), misturando-se gentilmente para precipitar o ácido nucléico. O material foi levado a -20°C por, no mínimo, 30 minutos. Nova centrifugação foi realizada à 14.000 rpm, por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado, permanecendo o precipitado no fundo do tubo. Este precipitado foi lavado com etanol 80% por duas vezes, usando-se 1 mL de etanol cada vez, por um período de 5 a 10 minutos. O etanol foi removido e o precipitado foi deixado para secar no ambiente. Após a secagem, o precipitado foi ressuspensionado em 100µL de água miliq ou em tampão TE (60,5 g Tris-base, 18,6 g EDTA, 500 mL de água, pH 8,0).

Com o objetivo de melhorar a qualidade do DNA obtido no processo de extração, uma parte do DNA foi purificada através do uso de produtos componentes do “Gene Clean Kit BIO 101” (Vista/CA). Para este fim, seguiu-se as instruções recomendadas pelo fabricante.

Condições de PCR

O DNA obtido de cada amostra foi diluído em água destilada deionizada (‘miliq’) na proporção de 1:5v/v. As reações de PCR foram conduzidas em volume final de 25 µL, contendo 18,35 µL de água, 2,1 µL de tampão 10X PCR, 2 µL de uma mistura de deoxinucleotídio trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo), e 0,17 µL de enzima Amplitaq (5U/µL). Para amplificação do fragmento correspondente ao 16SrDNA do fitoplasma foi empregado duplo PCR, usando-se os iniciadores universais (“primers”) R16mF2/mR1 na primeira reação (GUNDERSEN; LEE, 1996) e os iniciadores para grupo específico R16(I)F1/R16(I)R1 (LEE et al., 1994) na segunda reação. Os produtos obtidos na primeira amplificação foram diluídos em água deionizada na proporção 1:50 e submetidos à re-amplificação, utilizando-se o par de iniciadores específicos para identificação de grupo.

O controle positivo foi representado pelo DNA extraído de planta de milho infectada por fitoplasma e como controles negativos foram usados a água e o DNA obtido de plantas de milho saudáveis.

As reações de PCR foram processadas em um aparelho termociclador (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT). O programa estabelecido foi de 35 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as seguintes etapas: desnaturação por 1 minuto (2 minutos no primeiro ciclo) a 94° C, anelamento por 2 minutos a 50° C e extensão por 3 minutos a 72°C (7 minutos no último ciclo) (LEE et al., 1993).

A seqüência de iniciadores utilizados encontram-se descritas abaixo:

R16mF2 - 5' CAT GCA AGT CGA ACG A 3'

R16 mR1 - 5' CTT AAC CCC AAT CAT CGA C 3'

R16 (I) F1 - 5' TAA AAG ACC TAG CAA TAG 3'

R16(I)R1 - 5'CAA TCC GAA CTG AGA CTG T

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. Após a eletroforese, o gel foi imerso, para coloração, em uma solução de brometo de etídio por 10 minutos e, posteriormente, lavado em água destilada por 10 minutos. 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 1Kb ladder.

2.2.5 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP

Após a amplificação, os produtos de PCR provenientes de cada amostra foram analisados através da aplicação da técnica de RFLP. Para isto, uma alíquota de 4 µL de cada produto do PCR de cada amostra foi digerida, separadamente, com as enzimas de restrição *KpnI*, *MboI*, *AluI* e *RsaI*, seguindo-se as instruções do fabricante, durante um período de 30 horas a uma temperatura de 36°C. Os produtos resultantes da digestão enzimática foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, usando tampão TBE 10 X (108g de Tris-base, 55g de ácido ascórbico, 7,44 g de EDTA e 1000mL de água destilada).

A corrida eletroforética foi processada a 220 V por 5 minutos e 100 V por 105 minutos. Como marcador de peso molecular foi utilizado PhiX174RFHaeIII. O gel foi colorido através de imersão em brometo de etídio por 10 minutos e posterior lavagem em água destilada por 10 minutos. Os fragmentos de DNA, produtos da digestão, foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. Os padrões de bandas gerados para cada uma das amostras analisadas, em relação a cada uma das enzimas utilizadas, foram comparadas com os padrões de bandas apresentados pela amostra de planta de milho, usada como controle positivo.

2.2.6 Sobrevivência da cigarrinha nas espécies de forrageiras e ervas daninhas

A sobrevivência de insetos foi avaliada no mesmo ensaio de avaliação de possíveis hospedeiros alternativos para o fitoplasma do milho, conduzido com treze espécies botânicas e usando-se plantas de milho como padrão. Assim, em 10 plantas de cada espécie foram confinados 10 insetos por planta. A sobrevivência dos insetos nas diferentes espécies vegetais foi avaliada 24, 48, 72 e 96 horas após o confinamento dos insetos, através da contagem do número de indivíduos vivos nas plantas de cada espécie testada. Os resultados obtidos através da contagem dos insetos foram analisados utilizando-se o programa SAS Institute (1996).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Detecção de fitoplasma em plantas inoculadas

Dentre as plantas de milho inoculadas com fitoplasma, as quais serviram como controles positivos, 70 % das mesmas exibiram os sintomas típicos da doença. O sintoma predominante foi o avermelhamento de bordos foliares, justamente o sintoma inicial descrito em plantas infectadas por este patógeno (BEDENDO, 1999). Amostras foliares de plantas sintomáticas foram coletadas e submetidas aos testes de duplo PCR, utilizando-se os pares de iniciadores R16 mF2/R1 e R16(I)F1/R16(I) R1. Em 80 % das amostras avaliadas foi detectada a presença de fitoplasma, através da visualização de bandas de aproximadamente 1,1kb no gel de agarose. No entanto, nenhuma banda foi observada nas reações de PCR onde DNA de plantas sadias de milho ou água foram usados como controles negativos. Bandas de 1,1kb são características para fitoplasmas do grupo 16SrI, quando detectados através do emprego dos iniciadores específicos para a identificação de fitoplasmas pertencentes a este grupo de classificação (LEE et al., 1994). Estes resultados estão de acordo com relatos existentes, os quais identificaram o fitoplasma do milho como um membro do grupo 16SrI (BEDENDO; DAVIES; DALLY, 2000; LEE et al., 2004). Assim, a observação dos sintomas típicos de enfezamento associada à detecção do fitoplasma confirmaram o sucesso da inoculação, validando o teste para avaliação das espécies vegetais como possíveis hospedeiros alternativos do fitoplasma do milho.

Treze espécies botânicas foram avaliadas, tendo sido inoculadas 10 plantas de cada espécie e sendo mantidas cinco plantas sem inoculação, as quais serviram como testemunhas. Em nenhuma destas plantas houve manifestação de sintomas da doença, durante a duração dos ensaios.

Para cada espécie, amostras de folhas foram coletadas, separadamente, das dez plantas inoculadas e das cinco não inoculadas. Para cada planta amostrada foi obtido um total de 100µL de extrato contendo DNA. Em seguida, foi tomada uma alíquota de 10 µL de extrato de cada planta inoculada, obtendo-se uma amostra de DNA composta, representativa de cada espécie, para ser usada nos testes de PCR. O mesmo procedimento foi adotado para plantas não inoculadas.

Com base na amplificação do 16S rDNA, o fitoplasma foi detectado em três das espécies avaliadas, nas plantas inoculadas com o patógeno através de cigarrinhas infectivas (Figura 1). As

espécies que apresentaram resultados positivos foram capim marmelada, capim colônia e braquiária. A presença de fitoplasma nas plantas destas espécies foi evidenciada pela presença de bandas no gel de agarose, correspondentes a fragmentos amplificados de 1,1kb, típicos para os iniciadores usados no PCR (LEE et al., 1994). Em plantas não inoculadas destas mesmas espécies nenhuma banda foi visualizada no gel. Bandas de 1,1kb também foram observadas para amostra de milho usada como controle positivo, porém nenhuma banda foi visualizada para os controles negativos, representados pela água e DNA obtido de plantas saudias de milho, validando os resultados do teste de PCR.

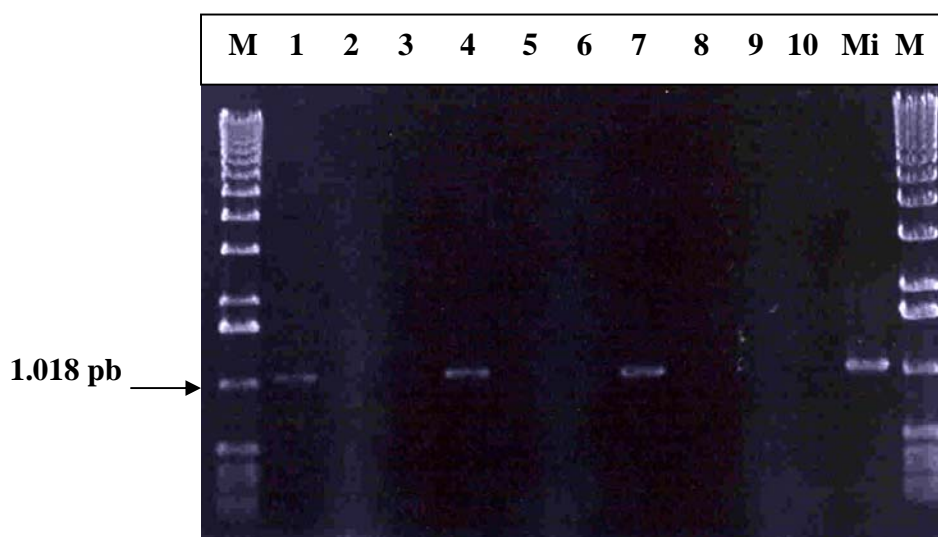


Figura 1 – Detecção do fitoplasma do enfezamento do milho em amostras de plantas daninhas e forrageiras, através de duplo PCR, usando iniciadores específicos para o grupo 16SrI. M= marcador molecular 1Kb ladder; Mi= amostra de milho (16SrI), 1= Braquiária (*B. decumben*), 2= Capim carrapicho (*C. echinatus*) 3=Capim colchão (*D. celiaries.*) 4= Capim Colônia (*P. maximum*). 5.= Corda de viola (*Ipomoea grandifolia*) 6.= Capim gordura (*M. minutiflora*) 7.= Capim marmelada (*B. plantaginea*) 8 = *Eleusine indica* 9= Picão preto (*B. pilosa*) 10= Serralha (*E. sanchifolia*). Os resultados para as espécies capim camelote (*R. exaltata*), capim amargoso (*D. insularis*) e nabiça (*Rhaphanus* sp) não estão representados no gel

Após a detecção do fitoplasma em amostras de DNA compostas, foram conduzidos testes de PCR com extrato de DNA obtido de cada uma das dez plantas inoculadas, pertencentes a cada uma das espécies que forneceram resultados positivo para a presença de fitoplasma. Neste caso, fitoplasma foi detectado em seis plantas de capim colônia, quatro plantas de capim marmelada e em uma planta de braquiária.

Estes resultados têm um significado importante e inédito, pois demonstraram que o agente do enfezamento pode ter como hospedeiros alternativos espécies que normalmente são encontradas nas proximidades ou mesmo dentro das áreas cultivadas com milho. A presença de fitoplasma nestas espécies revela também que a cigarrinha *D. maidis* tem o potencial de promover a transmissão do patógeno de plantas de milho para plantas de outras espécies botânicas. Além disto, um outro ponto relevante foi a constatação de ausência de sintomas em plantas portadoras de fitoplasma, mostrando que este tipo de hospedeiro pode se constituir num reservatório natural para o patógeno e atuar como fonte inóculo, sem ser identificado pela ocorrência de sintomas.

A evidência experimental de que plantas de capim colônia, capim marmelada e braquiária podem abrigar o fitoplasma do milho, coloca estas espécies como potenciais hospedeiros de fitoplasmas em condições naturais. No Brasil, de acordo com relatos existentes, o único representante da família das gramíneas que hospeda o fitoplasma é, justamente, o milho (KITAJIMA, 1994). No entanto, recentemente, foi demonstrada a presença de um fitoplasma do grupo 16SrI em plantas de capim marmelada coletadas em um campo comercial de milho com alta incidência de enfezamento vermelho; isto levou a se inferir que o fitoplasma presente nesta gramínea possivelmente fosse o mesmo encontrado no milho (BEDENDO et al., 2004). Apesar desta forte evidência do capim marmelada servir como hospedeiro alternativo para o fitoplasma do enfezamento, não existem referências que apontem a associação de fitoplasma com o capim colônia e a braquiária. O fato de gramíneas terem sido identificadas neste trabalho como hospedeiras do fitoplasma pode indicar que a proximidade botânica destas espécies com o milho possa ter influência no estabelecimento do patógeno. Esta consideração encontra amparo no trabalho de Tran-Nguyen et al. (2000), no qual foi relatado que algumas gramíneas como *Cenchrus setiger*, *Cenchrus ciliaris* e *Eragrostis falcata* podem atuar como hospedeiros alternativos para o fitoplasma da folha branca da cana-de-açúcar. Ainda, as espécies *Whiteochloa biciliata*, *Chloris inflata*, *Dactyloctenium aegyptium* e *Dactyloctenium radulans*, pertencentes à

família das gramíneas, também foram encontradas como sendo portadoras do fitoplasma associado à doença denominada “grassy shoot”, ocorrente em plantas de cana-de-açúcar, na Austrália (BLANCHE et al., 2003).

A identificação de espécies daninhas ou silvestres como hospedeiras alternativas para fitoplasmas de plantas comercialmente cultivadas também tem sido feita para algumas culturas perenes. Para o fitoplasma do amarelo da videira têm sido relatadas várias espécies daninhas que ocorrem nas vizinhanças ou no interior dos vinhedos e que podem abrigar o patógeno; entre estas espécies são citadas *Silene alba*, *Rubus* sp. *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Convolvulus arvensis*, *Plantago major*, *Pieris echinoides*, e *Taraxacum officinalis* (ARZONE et al., 1994). O fitoplasma associado à flavescência dourada, uma das mais sérias doenças da videira na Europa, foi detectado em plantas de *Clematis vitalba* naturalmente infectadas, presentes em vinhedos instalados na Itália (ANGELINE et al., 2003). Em trabalhos com detecção de fitoplasmas em plantas silvestres crescidas em áreas cultivadas com damasco no sul da França, foi demonstrada a ocorrência do fitoplasma agente da doença “Apricot chlorotic leaf roll” em espécies silvestres de *Prunus*, sp. e em plantas pertencentes às espécies *Fraxinus excelsior* e *Rosa canina* (JARAUSCH et al., 2001).

A ausência de sintomas em plantas portadoras de fitoplasmas se constitui num sério problema sob o ponto de vista epidemiológico. No caso das espécies hospedeiras do fitoplasma do enfezamento do milho, identificadas no presente trabalho, em nenhuma delas se observou o desenvolvimento de sintomas da doença, concordando com Lee; Davis e Gunderesen-rindal (2000), o qual menciona a ocorrência de certas espécies de plantas que não exibem sintomas em resposta à infecção por fitoplasma. A ausência de sintomas em plantas de capim colômbio, capim marmelada e braquiária infectados pelo fitoplasma do enfezamento não se constitui em novidade, pois existem diversos relatos similares para outras associações envolvendo planta e fitoplasma. Assim, Davis (2005) cita que plantas silvestres de *Vitis riparia* podem abrigar fitoplasmas que provocam sintomas severos quando presentes em plantas da espécie cultivada (*V. vinifera*). Em damasco, o fitoplasma associado à doença conhecida por “Apricot chlorotic leaf roll” foi detectado em plantas de *Fraxinus excelsior* e *Rosa canina* que não apresentavam nenhum sintoma da doença (JARAUSCH et al., 2001). As plantas assintomáticas portadoras de fitoplasma desempenham um papel importante na epidemiologia das doenças, pois podem atuar na sobrevivência do patógeno e servirem como fonte de inóculo

para a cultura principal. Por esta razão, as investigações conduzidas no sentido de detectar fitoplasmas em plantas daninhas e silvestres podem fornecer subsídios valiosos para a compreensão da ocorrência de epidemias causadas por fitoplasmas (BERTACCINI, 2005).

2.4.3 Identificação de fitoplasma através da análise de RFLP

A confirmação dos fitoplasmas detectados em plantas de capim colonião, capim marmelada e braquiária foi realizada pela aplicação da técnica de RFLP. Para cada uma destas espécies e para o milho usado como padrão, os produtos amplificados pelos pares de iniciadores R16mF2/mR1 e R16(I)F1/R16(I)R1 usados em duplo PCR foram submetidos à digestão enzimática com as endonucleases *AluI*, *KpnI*, *MboI* e *RsaI*

As análises mostraram que os fitoplasmas presentes nas amostras das gramíneas e no material de milho apresentaram perfis eletroforéticos idênticos entre si, para cada uma das enzimas de restrição consideradas individualmente (Figuras 2 e 3). Estes resultados confirmaram, como já era esperado, que o fitoplasma transmitido do milho para plantas das três espécies hospedeiras é o agente do enfezamento vermelho.

Neste trabalho, os perfis eletroforéticos apresentados pelo fitoplasma do enfezamento, com exceção da enzima *MboI*, não corresponderam aos padrões internacionais considerados para a identificação de fitoplasmas em grupos de classificação (LEE et al., 1998). Na classificação de fitoplasmas proposta internacionalmente, a digestão enzimática é processada com produtos de PCR amplificados pelos iniciadores R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996), enquanto no presente estudo a digestão enzimática foi conduzida com produtos de R16(I)F1/R16(I)R1 (LEE et al., 1994). Desta forma, os fragmentos alvos da ação enzimática foram fragmentos distintos. Ressalta-se mais uma vez que a análise de RFLP realizada neste trabalho teve como finalidade demonstrar um resultado já esperado de que os fitoplasmas detectados nas plantas de capim colonião, capim marmelada e braquiária eram idênticos ao fitoplasma do enfezamento vermelho presente nas plantas de milho, usadas nas inoculações como fontes do patógeno.

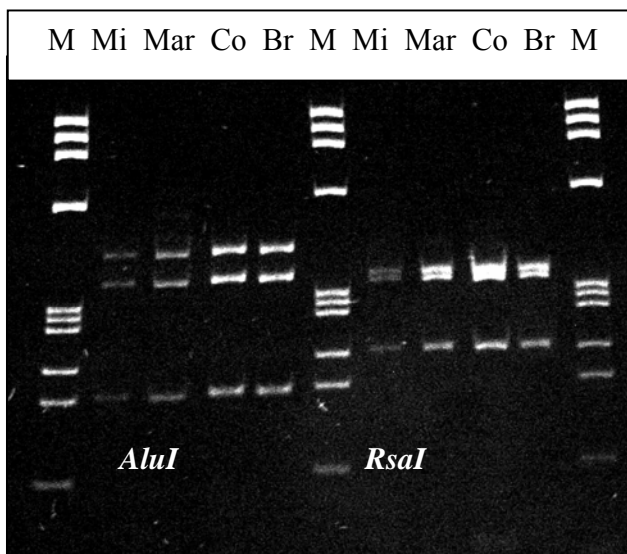


Figura 2 – Análises de RFLP usando as endonucleases *AluI* e *RsaI* para digestão enzimática dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos mF2/mR1 e R16(I)F1/R16(I)R1. Colunas: Mi= Milho, Mar= Capim Marmelada (*B.plantaginea*), Col= Capim colônia (*P. maximum*), Bra= Braquiária (*B. decumbens*), M= padrão de peso molecular (Φ X174RFHaeIII – cima p/baixo: 1356 pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb, 310 pb, 271 pb, 281 pb, 234pb, 194pb, 118 pb, 72pb)

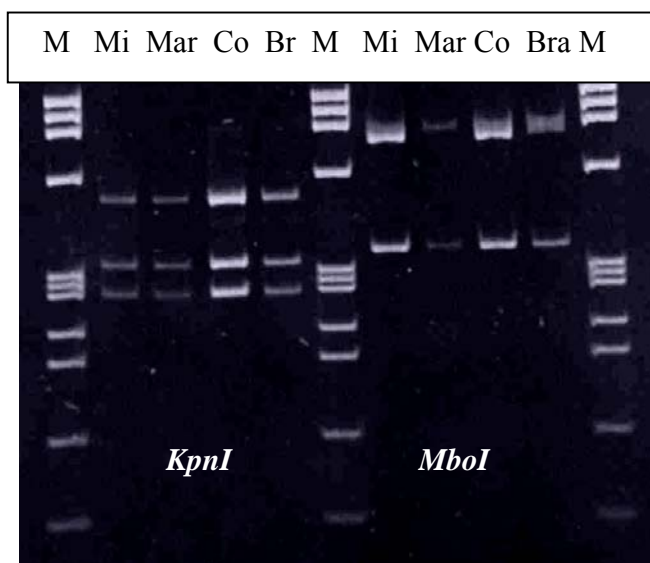


Figura 3 – Análises de RFLP usando as endonucleases *KpnI* e *MboI* para digestão enzimática dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos mF2/mR1 e R16(I)F1/R16(I)R1. Colunas: Mi= Milho, Mar= Capim Marmelada (*B.plantaginea*), Co= Capim colônia (*P. maximum*), Br= Braquiária (*B. decumbens*), M= padrão de peso molecular (Φ X174RFHaeIII – cima p/baixo: 1356 pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb, 310 pb, 271 pb, 281 pb, 234pb, 194pb, 118 pb, 72pb)

2.3.4 Sobrevivência da cigarrinha vetora nas espécies de forrageiras e ervas daninhas

A sobrevivência do inseto foi variável entre as diversas espécies botânicas testadas para determinação de possíveis hospedeiros para o vetor do fitoplasma do enfezamento (Tabela1).

A análise estatística mostrou que nas primeiras 24h após o início do confinamento das cigarrinhas nas plantas, a sobrevivência do inseto no capim colonião, picão preto, capim amargoso e corda de viola não diferiu da sobrevivência do inseto observada em plantas de milho; nestes casos, oito insetos, em média, estavam vivos ao final de 24h após o início do confinamento.

A segunda contagem, feita 48h após o início do confinamento, revelou que a população de insetos permaneceu praticamente constante nas plantas de milho, porém ocorreu significativa redução no número de insetos vivos presentes nas espécies que não diferiram do milho, na avaliação das 24h. Estes resultados foram similares quando as cigarrinhas sobreviventes foram contadas 72h após o início do confinamento, mantendo-se, portanto, a tendência de redução da população com o tempo.

Na avaliação final, realizada 96h após o início do confinamento dos vetores nas plantas, ficou demonstrado a ocorrência de grupos definidos quanto à capacidade de sobrevivência no milho e nas diversas espécies botânicas testadas como possíveis hospedeiras. Assim, pode ser notado que, praticamente, a população de insetos se manteve constante nas plantas de milho, ao longo do período de avaliação. O capim colonião propiciou condições adequadas para a sobrevivência da cigarrinha, embora diferindo significativamente do milho; neste capim, cerca de 50-60% dos indivíduos conseguiram sobreviver, comparada a sobrevivência de 90-100% registrada para os insetos hospedados em plantas de milho. O capim marmelada foi mais favorável à sobrevivência de *D. maidis* do que braquiária e capim colchão, sendo que estes dois últimos foram os menos favoráveis do grupo, quanto à característica de fornecerem condições para sobrevivência do vetor.

Passa-se a analisar, comparativamente, o comportamento do capim colonião, capim marmelada e braquiária, nos quais foi constatada a presença de fitoplasma transmitido através de inoculação por vetor, quanto à capacidade de permitirem a sobrevivência do vetor. Dentro das primeiras 24h após o início confinamento, um número significativamente maior de insetos foi contado nas plantas de capim colonião e braquiária, em comparação com capim marmelada. A

contagem feita 48h após o início do confinamento, não apontou alteração para o capim colômbio, mas mostrou uma queda brusca no número de insetos presentes na braquiária e, por esta razão, os valores de sobrevivência registrados para esta gramínea passaram a não mais diferir estatisticamente dos valores obtidos para o capim marmelada. Na avaliação feita 72 horas após o início do confinamento, os resultados obtidos na avaliação anterior não se alteraram, em termos estatísticos. No entanto, na contagem final realizada 96h após o início do confinamento, o número de insetos encontrados nas plantas de capim colômbio foi significativamente maior do que aquele presente no capim marmelada, o qual foi significativamente maior que o número de vetores contados nas plantas de braquiária. Estes resultados deixam claro que no capim colômbio houve uma queda inicial no número de insetos, porém a população manteve os níveis de sobrevivência durante a execução dos experimentos; no capim marmelada, a população de insetos foi praticamente reduzida em 60% dentro das primeiras 24h, porém se manteve estável até o final do ensaio; e no capim braquiária o número de insetos foi reduzido de forma constante a partir do início do confinamento, chegando ao final com uma média de menos de um inseto por planta. Estes resultados talvez possam justificar a presença de fitoplasma num maior número de plantas de capim colômbio do que em plantas de capim marmelada, que por sua vez mostrou um número maior de plantas infectadas do que o capim braquiária. São resultados interessantes que poderão servir de subsídios para novas investigações sobre o assunto.

A demonstração de que os capins colômbio, marmelada e braquiária podem manter uma população viva do vetor por algum tempo, representado pelo período de duração dos ensaios conduzidos no presente estudo, não implica em que estas espécies possam ser classificadas como hospedeiras de *D. maidis*. Para tanto, outros parâmetros deveriam ser avaliados, tais como a postura do inseto na planta, o desenvolvimento das ninfas e a formação de nova colônia.

Para o caso específico do capim marmelada, relatado como possível hospedeiro do fitoplasma do milho (BEDENDO et al., 2004), quando da coleta das amostras deste capim, nas proximidades da cultura de milho, foi observada a ocorrência de grande número de cigarrinhas da espécie *D. maidis* presente nas plantas de marmelada (KIMATI, comunicação pessoal). Esta observação, aliada aos resultados obtidos no presente estudo, reforça as evidências de que esta espécie possa estar atuando com hospedeiro alternativo de *D. maidis*. Muito poucas são as espécies botânicas consideradas hospedeiras alternativas para esta cigarrinha, entre elas estão citadas tripsacum (*Tripsacum dactyloides.*) e teosinto (*Euchlaena mexicana*) em relatos de Tsai e

Falk (1988). Aveia (*Avena fatua*), Capim massarombá (*Sorghum halepense*), centeio (*Hordeum vulgare*), *Rottboelia* sp. e áster (*Callistephus chinensis*) têm sido referidas como possíveis “planta- alimento” para o vetor, no entanto não está definido o papel destas espécies como hospedeiras alternativas para a cigarrinha (SUMMERS et al.,2004). A ocorrência de adultos e ovos de *D.maidis* também foi observada em plantas de sorgo presentes em áreas experimentais, evidenciando que, além do milho, o sorgo poderia estar atuando como hospedeiro do inseto (WAQUIL, 1997). A demonstração, neste estudo, de que três espécies comuns de gramíneas podem abrigar o fitoplasma do enfezamento do milho e, potencialmente, atuarem como hospedeiros alternativos tanto para o fitoplasma como para o seu vetor, se constitui numa evidência importante, pois segundo Oliveira (2000), são escassas as informações a respeito da estratégia de sobrevivência do inseto na entressafra e dos fatores que condicionam o seu aparecimento súbito em campos de milho recém implantados.

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

Planta hospedeira	Tempo de inoculação							
	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas	
Milho	9,94 ± 0,02	a	9,90 ± 0,038	a	9,83 ± 0,22	a	9,65 ± 0,66	a
Capim Colonião	7,60 ± 0,34	ab	6,80 ± 0,51	b	6,10 ± 0,60	b	5,70 ± 0,61	b
Capim Marmelada	3,00 ± 0,95	c	2,70 ± 0,89	cde	2,40 ± 0,86	c	2,30 ± 0,86	c
Picão Preto	7,70 ± 0,54	ab	3,70 ± 0,21	cd	2,00 ± 0,33	cd	1,90 ± 0,35	cd
Rottboelia exaltata	4,10 ± 0,50	c	2,80 ± 0,53	cde	2,00 ± 0,22	cd	1,70 ± 0,34	cd
Capim amargoso	7,80 ± 0,44	ab	4,50 ± 0,40	bc	2,40 ± 0,22	c	1,60 ± 0,40	cd
Nabiça	6,90 ± 0,57	b	2,10 ± 0,43	cde	1,80 ± 0,33	cd	1,50 ± 0,37	cd
Capim Gordura	2,60 ± 0,92	c	2,10 ± 0,89	cde	1,20 ± 0,53	cd	1,10 ± 0,50	cd
Capim Pé de Galinha	2,20 ± 0,73	c	1,90 ± 0,62	de	1,50 ± 0,50	cd	1,10 ± 0,46	cd
Corda-de -viola	7,80 ± 0,29	ab	3,50 ± 0,45	cd	1,40 ± 0,31	cd	0,80 ± 0,36	cd
Capim Carrapicho	3,60 ± 0,37	c	1,70 ± 0,26	de	0,80 ± 0,33	cd	0,80 ± 0,33	cd
Serralha	3,10 ± 0,41	c	0,40 ± 0,16	e	0,40 ± 0,16	cd	0,40 ± 0,16	cd
Braquiária	6,80 ± 0,33	b	3,30 ± 0,50	cd	1,70 ± 0,62	cd	0,20 ± 0,13	d
Capim Colchão	2,00 ± 0,42	c	3,30 ± 0,30	e	0,10 ± 0,10	d	0,00 ± 0,00	d

Tratamentos com médias identificadas pela mesma letra, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de significância $p < 0,05$

3 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nos objetivos inicialmente propostos, o presente estudo permitiu concluir que as gramíneas, capim colonião (*Panicum maximum*), capim marmelada (*Brachiaria plantaginea*) e capim braquiária (*Brachiaria decumbens*), podem atuar como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e para seu vetor, a cigarrinha *Dalbulus maidis*.

REFERÊNCIAS

- ALTSTATT, G.E. A new corn disease in the Rio Grande Valley. **Plant Disease Reporter**, St.Paul, v.29, p.533-534, 1945.
- ANGELINE, E.; SQUIZZATO, F.; LUCCHETTA, G.; BORGIO, M. Detection of a phytoplasma associated with grapevine *Flavescence dorée* in *Clematis vitalba*. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v.110, p193-201.Mar.2004.
- 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.
- BEDENDO, I.P. Micoplasmas e espiroplasmas de plantas: importância, diagnose, detecção e identificação. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v.21, p.84-85, 1995.
- BEDENDO, I.P. Enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho associado ao fitoplasma e espiroplasma: sintomatologia, etiologia e técnicas para detecção e identificação destes agentes. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v.25, p. 190-196, 1999.
- BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Molecular evidence for the presence of maize bushy stunt phytoplasma in corn in Brazil. **Plant Disease**, St.Paul, v.81, p.957, 1997.
- BEDENDO, I.P.; DAVIES, R.E.; DALLY, E. Detection and identification of maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. **International Journal of Pest Management**, Cardiff, v.46, p.73-76, 2000.
- BEDENDO, I.P.; BRUNELLI, K.R.; KIMATI, H.; RIBEIRO, L.F. Ocorrência de fitoplasma em plantas de capim marmelada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.S187, 2004. suplemento.
- BERTACCINI, A. **Phytoplasmas and yellows disease**. Disponível em: <http://web.uniud.it/phytoplasma/pap/bert8310.html> .Acesso em: 11 nov.2005.
- BIANCHI, M.A. Manejo integrado de plantas daninhas no sistema plantio direto. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE MANEJO E CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS, 1, 1998, Passo Fundo. **Palestras...** Passo Fundo: Aldeia Norte, 1998, p.108-118.
- BLANCHE, K.R.; TRAN-NGUYEN, L.T.T.; GIBB, K.S. Detection, identification and significance of phytoplasmas in grasses in northern Australia. **Plant Pathology**, St.Paul, v.52, p.505-512, Mar.2003.
- BRADFUTE, O.E.; TSAI, J.H.; GORDON, D.T. corn stunt spiroplasma and viruses associated with a maize disease epidemic in southern Florida. **Plant Disease**, St.Paul, v.65, p.837-841, 1981.

CASTRO, V.; RIVERA, C.; ISARD, S.A.; GÁMEZ, R.; FLETCHER, J.; IRWIN, M.E. The influence of weather and microclimate on *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) flight activity and the incidence of diseases within maize and bean monocultures and bicultures in tropical America. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v.121, p.469-482, 1992.

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

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. **An introduction to the first internet conference on phytopathogenic mollicutes, selected research topics and look to the future**. Disponível em: <http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/davi8940.html>. Acesso em: 25 out.2005.

DAVIS, R.E.; LEE, I.M. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, p.1008-1011, 1993.

EBBERT, M.; NAULT, L.R. Survival in *Dalbulus* leafhopper vectors improves after exposure to maize stunting pathogens. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v.100, p.311-324, June 2001.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. Manejo de plantas daninhas. In:_____. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2004. cap.5, p.183-215.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2005**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p.409-421.

FRIZZAS, M.R. **Levantamento de insetos em plantas daninhas na entressafra das culturas da soja e do milho em Jaboticabal (SP)**. 1998. 102p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

GARCIA, J.C. Evolução da área e produtividade do milho “safrinha”. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO “SAFRINHA, 1997, Assis. **Anais...** Assis: IAC/CDV, 1997. p.11-14.

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

HARRISON, N.A.; RICHARDSON, P.A.; TSAI, J.H.; EBBERT, M.A.; KRAMER, J.B. PCR assay for detection of phytoplasmas associated with maize bushy stunt disease. **Plant Disease**, St.Paul, v.80, p. 263-269, 1996.

HRUSKA, A.J.; GLADSTONE, S.M.; OBANDO, R.E. Epidemic roller coaster: maize stunt disease in Nicaragua. **American Entomologist**, Lanham, v.42, p.248-252, 1996.

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 – affected orchards in southern France. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v.107, p.209-217, 2001.

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.

KITAJIMA, E.W.; NAZARENO, N.R.X. Levantamento de vírus e mollicutes do milho no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, p.613-625, 1985.

LEE, I.-M.; DAVIES, 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.; DAVIES, 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.; DAVIES, R.E.; BOTTFNER, K.D.; MARCONE, C.; SEMULLER, E. ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Oxford, v.54, p.1037-1048, 2004.

LEE, I.-M.; HAMMOND, R.W.; DAVIES, R.E.; GUNDERSEN, D.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16 S r DNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, St.Paul, v.83, p.834-842, 1993.

LENARDON, S.L.; LAGUNA, I.G.; GORDON, D.T.; TRUOL, G.A.; GOMEZ, J.; BRADFUTE, O.E. Identification of corn spiroplasma in maize from Argentina. **Plant Disease**, St Paul, v.77, p.100, 1993.

LOPES, J.R.S.; OLIVEIRA, C.M. Vetores de vírus e mollicutes em milho In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. cap.2, p.35-60.

MASSOLA JÚNIOR, N.S. **Avaliação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido na cultura do milho**. 1998. 75 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

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

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. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v.90, p.521-541, 1997.

OLIVEIRA, C.M. **Variação genética entre populações de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: 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.; DUARTE, A.P.; CARVALHO, R.V.; OLIVEIRA, A.C. Mollicutes e vírus na cultura do milho no Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. cap.2, p.35-60.

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

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

PECCI, M.P.G.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, R.O.; LAGUNA, I.G.; CONCI, L.R.; AVILA, A.; HERRERA, P.; GALDEANO, E.; VIRLA, E.; NOME, C.F. Ocorrência de doenças causadas por mollicutes e por vírus em milho nas províncias de Tucumán e de Córdoba na Argentina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.127, n.4,403-407, jul./ago.2002.

POWE, A.G. Plant community diversity, herbivore movement, and an insect transmitted disease of maize. **Ecology**, New York, v.68, p.1658-1669, 1987.

SAS INSTITUTE. **Guia do usuário SAS/STAT**: versão 6. Cary, 1996. 1028 p.

SUMMERS, C.G.; NEWTON, A.S.Jr.; OPGENORTH, D.C. Overwinterring of corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), and *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) in California's San Joaquin Valley. **Environmental Entomology**, Lanham, v.33, n.6, p.1644-1651, Dec.2004.

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, June 2000.

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. 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, 1998. p.209-221.

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.

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. cap.10, p.488-533.