

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

**Avaliação do uso de silício no patossistema milho-fitoplasma em condições  
experimentais**

**Tulio Veríssimo Martins**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre  
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba  
2021**

**Tulio Veríssimo Martins**  
**Engenheiro agrônomo**

**Avaliação do uso de silício no patossistema milho-fitoplasma em condições  
experimentais**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre  
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba**  
**2021**

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

Martins, Tulio Veríssimo

Avaliação do uso de silício no patossistema milho-fitoplasma em condições experimentais / Tulio Veríssimo Martins. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011 - - Piracicaba, 2021.

46 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

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

Aos meus pais Antônio Carlos e Edna Aparecida, à minha avó Aparecida Pacheco (*in memoriam*), à minha irmã Taynara e minha sobrinha Laura, à minha esposa Isabella Cristina,

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por ser minha fonte de forças nos momentos difíceis.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia pela oportunidade concedida para a realização do mestrado. Ao corpo docente e funcionários, pela dedicação e amizade ao longo do mestrado.

À minha avó Aparecida Pacheco (*in memoriam*) por todo o incentivo e pelo exemplo de caráter, humildade e perseverança. Foi difícil chegar até aqui, sem suas palavras de apoio, seu colo acolhedor e seu beijo revigorante. Guardo sua memória em meu coração, onde o amor que sinto por você sempre estará vivo.

Aos meus pais Antônio Carlos e Edna Aparecida por serem meu porto seguro e não medirem esforços para me ajudar ao longo dessa caminhada. Vocês se sacrificaram, se dedicaram, abdicaram seus projetos para que eu tivesse a oportunidade de estudar. Eu devo tudo que sou a vocês. Sem vocês, nada disso seria possível.

À minha irmã Taynara Veríssimo, pelo incentivo. Por ser meu exemplo de dedicação, força e coragem.

À minha esposa Isabella Cristina pelo apoio, paciência, companheirismo e amor. Por compartilhar esse sonho comigo.

Aos meus familiares, pelo incentivo e carinho ao longo dessa caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo, pela orientação, dedicação e paciência.

Aos meus amigos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, em especial, Camila Ferro, Cláudia Almeida, Eike Yudi, Felipe Franco (e Vanessa Takeshita), Gabriel Favara (e Cintia Crespam), Heron Kraide e Jacson Ferreira pelo companheirismo, amizade e ajuda.

A todos amigos, em especial, Bruna Gonçalves, Charles Lacerda, Filipe Mendonça e Mariana Lüdtke, pelo companheirismo e amizade.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista.

**Meus sinceros agradecimentos!**

“Tenham fé em Deus e não duvide no seu coração, mas acredite que vai acontecer, assim acontecerá...” Mc, 11:22-24

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1. Cultura do milho.....	11
2.2. Fitoplasmas .....	12
2.3. Enfezamento vermelho do milho .....	13
2.4. Uso de silício no manejo de doenças.....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. Obtenção de populações infectantes e não infectantes de cigarrinhas .....	17
3.2. Uso de silício em plantas de milho crescidas no campo.....	17
3.3. Uso de silício em plantas de milho em casa de vegetação .....	18
3.4. Aplicação da fonte de silício e inoculação experimental .....	19
3.5. Coleta de dados e colheita das espigas .....	19
3.6. Extração, quantificação e padronização do DNA total de plantas .....	20
3.7. Extração do DNA total de cigarrinhas.....	20
3.8. Detecção do fitoplasma por “nested”-PCR.....	21
3.9. Quantificação do patógeno em tecido vegetal .....	21
3.10. Análise estatística .....	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
4.1. Detecção do fitoplasma.....	23
4.2. Sintomatologia das plantas .....	25
4.3. Componentes de produção.....	27
4.3.1. Altura de plantas.....	27
4.3.2. Diâmetro de colmo .....	29
4.3.3. Número de espigas por planta .....	30
4.3.4. Comprimento e diâmetro de espiga .....	31
4.3.5. Número de fileiras de grãos por espiga .....	32
4.3.6. Peso total de grãos por planta.....	33
4.4. Quantificação do patógeno em tecido vegetal .....	36
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>40</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>

## RESUMO

### **Avaliação do uso de silício no patossistema milho-fitoplasma em condições experimentais**

O enfezamento vermelho do milho causado por um fitoplasma é considerado uma das principais doenças da cultura no Brasil. Com a expressividade do cultivo do milho “safrinha” a doença tem apresentado grande relevância. As medidas de controle conhecidas para o patossistema são limitadas. O manejo envolve o plantio de genótipos resistentes, uso de inseticidas para combate ao inseto vetor e evitar plantios tardios. No entanto, os plantios tardios, chamados de “safrinha”, são responsáveis por grande parte da produção nacional. Portanto, novas estratégias de manejo devem ser pesquisadas. O uso do silício tem relevado um efeito positivo sobre diversos patossistemas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação de silício como uma alternativa para minimizar os danos causados pela doença. Para isto, foram realizados experimentos em campo e casa de vegetação. O silício foi utilizado em aplicações no solo e/ou via foliar e as plantas de milho foram inoculadas com o fitoplasma por meio de cigarrinhas infectantes. As avaliações foram realizadas com base na detecção e quantificação do patógeno nas plantas inoculadas e nos componentes de produção, tais como altura de plantas, diâmetro de colmo, número de espigas por planta, comprimento, diâmetro e número de fileiras de grãos nas espigas, e peso total de grãos. O uso do silício aplicado no solo e/ou via foliar, nas doses usadas nos ensaios, não promoveu efeito positivo em plantas inoculadas com o fitoplasma. Os resultados mostraram que o fitoplasma apresentou distribuição e concentração variáveis nas diferentes partes amostradas das plantas, com maiores concentrações do patógeno encontradas no sistema radicular, seguido de folhas do terço inferior e do terço superior das plantas infectadas. Em razão da relevância deste nutriente mineral como agente promotor de resistência a doenças em vários patossistemas, é importante considerar novos estudos com outras fontes de silício, doses, forma e período de aplicação.

Palavras-chave: *Zea mays*, Mollicutes, *Dalbulus maidis*, Enfezamento vermelho, Controle alternativo

## ABSTRACT

### **Evaluation of the use of silicon in the corn-phytoplasma pathosystem under experimental conditions**

Maize bushy stunt caused by a phytoplasma is considered one of the main diseases of the crop in Brazil. With the expressiveness of the cultivation of “safrinha” corn, the disease has shown great relevance. Known control measures for the pathosystem are limited. Management involves planting resistant genotypes, using insecticides to combat the vector insect and avoiding late planting. However, late plantings, called “safrinha”, are responsible for a large part of the national production. Therefore, new management strategies must be researched. The use of silicon has shown a positive effect on several pathosystems. Thus, the objective of this work was to evaluate the application of silicon as an alternative to minimize the damage caused by the disease. For this, field and greenhouse experiments were carried out. Silicon was used in soil and/or foliar applications and maize plants were inoculated with phytoplasma through infective leafhoppers. The evaluations were carried out based on the detection and quantification of the pathogen in the inoculated plants and production components, such as plant height, stem diameter, number of ears per plant, length, diameter and number of grain rows in the ears, and total grain weight. The use of silicon applied to the soil and/or foliar, at the doses used in the tests, did not promote a positive effect on plants inoculated with the phytoplasma. The results showed that phytoplasma presented variable distribution and concentration in the different sampled parts of the plants, with higher concentrations of the pathogen found in the root system, followed by leaves from the lower and upper thirds of the infected plants. Due to the relevance of this mineral nutrient as an agent that promotes disease resistance in various pathosystems, it is important to consider further studies with other silicon sources, doses, form and application period.

**Keywords:** *Zea mays*, Mollicutes, *Dalbulus maidis*, Maize bushy stunt, Alternative control

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a produção mundial de milho alcança cerca de um bilhão de toneladas, sendo utilizada principalmente na alimentação humana e animal. Nas projeções de produção da safra de 2020/21, os Estados Unidos, China e Brasil representam 64,2% da produção global (USDA, 2021). O milho é cultivado em todo o território brasileiro, em duas épocas de plantio, milho primeira safra ou verão e milho segunda safra ou “safrinha”, que juntas fazem com que o país seja o terceiro maior produtor mundial (CONTINI et al., 2019). As estimativas indicam uma área colhida na safra 2020/21 de 19,7 milhões de hectares e produtividade de 5.526 kg/ha, com produção total de 108,96 milhões de toneladas. No estado de São Paulo, a cultura tem obtido resultados satisfatórios de produtividade com um incremento de 9,1% comparado à safra anterior e produção de 4.560,9 toneladas (CONAB, 2021).

Embora dados de alta produção tenham sido obtidos, vários são os fatores que podem influenciar na produtividade, como cultivar, solo, clima, práticas culturais e manejo de pragas e doenças. Muitos fitopatógenos ocorrem na cultura e podem atuar negativamente nos componentes de produção. Entre estes fatores, os enfezamentos, causados por molicutes, têm sido relevantes, devido à expressividade do cultivo do milho “safrinha”, que ocorre em condições favoráveis para o desenvolvimento do inseto vetor e conseqüentemente da doença. (CONAB, 2021; SABATO, 2017).

Um dos tipos de enfezamento ocorrente no milho é denominado de enfezamento vermelho, causado por fitoplasma. Os fitoplasmas são procariotos, sem parede celular, parasitas obrigatórios, com genoma reduzido, sendo encontrados no floema de plantas infectadas. Na safra 2015/16 alta incidência e severidade da doença foram registradas no país, especialmente nos plantios conduzidos nos estados de Goiás, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul e São Paulo. (SABATO, 2017). A cigarrinha do milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), tem papel fundamental na disseminação e transmissão do patógeno, contribuindo diretamente nos danos resultantes da doença. (MADDEN & NAULT, 1983; NAULT, 1980; SABATO, 2017). Múltiplos sintomas podem ser observados em plantas infectadas, tais como folhas inicialmente cloróticas nos bordos e ápice, com posterior avermelhamento; redução dos entrenós e no crescimento da planta; proliferação de pequenas espigas; formação de grãos imperfeitos; perfilhamento basal e axilar; afinamento de colmo; florescimento precoce; e redução do volume do sistema radicular. A sintomatologia é variável, de acordo com a resistência do híbrido/variedade, fatores ambientais e estágio de desenvolvimento da planta no momento da infecção (BEDENDO, 2018; OLIVEIRA & PAIVA, 2004).

O manejo envolve o plantio de genótipos parcialmente resistentes, o uso de produtos químicos para combater o vetor e a escolha de época de plantio, para evitar semeadura tardia. No entanto, esta última medida é inviável, pois, atualmente, a “safrinha” é responsável pela maior parte da produção brasileira. Assim, alternativas precisam ser pesquisadas para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo. Uma destas alternativas é a aplicação de silício (Si), pois diversos estudos têm revelado um efeito positivo deste nutriente mineral sobre o controle de doenças que ocorrem em diversos patossistemas, tais como arroz-*Bipolaris oryzae*, (ZANÃO JÚNIOR, 2009), sorgo-*Colletotrichum sublineolum* (RESENDE et al., 2013) e cana-de-açúcar-*Puccinia melanocephala* (NAIDOO et al., 2009). Embora o silício não seja um nutriente essencial, a sua relevância tem sido considerável, devido ao seu potencial na redução da intensidade da doença, por conferir resistência à planta. O mecanismo de ação deste elemento possivelmente está relacionado com o estabelecimento de barreira física por sua deposição nos tecidos vegetais (BARROS et al., 2010; POZZA et al., 2015; ZAMBOLIM et al., 2012; ZAMBOLIM & ZANÃO JÚNIOR, 2012). Existem evidências que o silício promova também a resistência de plantas a insetos (LIANG, et al., 2015).

Considerando a relevância do enfezamento vermelho na cultura do milho e o potencial do silício como agente promotor de resistência, é justificável explorar o efeito promissor deste nutriente mineral como uma alternativa para minimizar os danos causados pela doença.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Cultura do milho

O milho, *Zea mays* L., é uma das plantas cultivadas de maior importância como alimento humano e de animais domesticados, além de ser utilizado na indústria como base para numerosos produtos. É uma gramínea pertencente à família Poaceae e seu centro de origem e processo de domesticação não são ainda bem conhecidos. A partir de evidências recentes, acredita-se que seu centro de origem seja o México, em razão de seu parente selvagem denominado teosinto ser restrito a essa região e de vestígios arqueológicos que apontam seu cultivo por civilizações antigas (CONTINI et al., 2019; MÔRO & FRITSCHÉ-NETO, 2015).

A planta de milho possui metabolismo fotossintético eficiente, do tipo C4, e apresenta boa adaptação aos diversos ambientes, devido às suas características botânicas. Em virtude de sua adaptabilidade, por meio de seleção de cultivares e aprimoramento dos métodos de manejo, o milho tem sido cultivado em distintas regiões, entre 58° de latitude Norte a 40° de latitude Sul, e em diversas altitudes, desde abaixo do nível do mar até locais com mais de 2.500 metros de altura. As condições climáticas são fatores que podem influenciar a produção e muitas pesquisas têm sido direcionadas para explorar as potencialidades da cultura. Dentre os componentes ambientais, algumas características são consideradas ideais, como a temperatura do solo acima de 10°C para semeadura e germinação, associada à umidade adequada. No decorrer do crescimento e desenvolvimento, a temperatura ideal deve estar em torno de 25°C, aliada à disponibilidade adequada de água no solo e luz abundante. Durante a floração e enchimento de grãos, são necessárias condições apropriadas de temperatura e luminosidade, elevada disponibilidade de água no solo e umidade relativa superior a 70%. No fim do ciclo da cultura é fundamental a ocorrência de um período seco para a realização da colheita (BERGAMASCHI & MATZENAUER, 2014; FANCELLI & DOURADO NETO, 2015).

Ao longo das últimas décadas, o milho obteve a marca de um bilhão de toneladas produzidas no mundo, sendo grande parte da produção obtida por poucos países. Assim, na safra de 2020/21, os Estados Unidos, China e Brasil representam 64,2% da produção global, com 31,7% (360,2 milhões de toneladas), 22,9% (260,7 milhões de toneladas) e 9,6% (109,0 milhões de toneladas), respectivamente (CONTINI et al., 2019; USDA, 2021). No Brasil, o milho é cultivado em todas as regiões, porém as épocas de plantio são variáveis, devido às características climáticas de cada local. No cultivo de primeira safra (cultivo no verão), a semeadura é realizada na primavera/verão e predomina na maior parte das regiões produtoras.

O cultivo do milho com semeadura realizada no verão/outono, após a safra de soja, é conhecido por “safrinha”. Atualmente, a primeira safra tem menor representatividade, uma vez que os produtores têm preferência pelo cultivo de soja, por apresentar estrutura de comercialização mais vantajosa. Com isto, a produção da “safrinha” é, presentemente, responsável pela maior parte da produção brasileira de milho. (CONTINI et al., 2019; CONAB, 2021).

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho e as estimativas indicam uma área colhida na safra 2020/21 de 19,7 milhões de hectares e produtividade de 5.526 kg/ha, com produção total de aproximadamente 109,0 milhões de toneladas. Em São Paulo, a área plantada foi de 865,9 mil hectares, com produtividade média de 5.267 Kg/ha (incremento de 9,1% em relação à safra 2019/20), totalizando uma produção de 4.560,9 toneladas (CONAB, 2021). Apesar da considerável produtividade atingida pela cultura, diversos são os fatores que podem interferir com esta variável, entre elas, cultivar, solo, clima, práticas culturais e manejo de pragas e doenças.

## 2.2. Fitoplasmas

São procariotos pertencentes ao Domínio *Bacteria*, Filo *Tenericutes*, Classe *Mollicutes*, Ordem *Acholeplasmatales*, Família *Acholeplasmataceae* e Gênero ‘*Candidatus Phytoplasma*’ (BEDENDO, 2018; FIRRAO et al., 2004). Mundialmente, estes fitopatógenos são capazes de causar doenças em mais de 700 espécies de plantas (MAEJIMA et al., 2014). Os fitoplasmas são parasitas obrigatórios, com genoma reduzido (680 – 1.600 kb), sem parede celular, sendo a célula envolvida somente pela membrana plasmática (BEDENDO, 2018). Em razão disto, a célula possui característica pleomórfica e pode ser visualizada no floema de plantas infectadas com diferentes formas. As células de fitoplasmas são diminutas (200 a 800nm) quando comparadas às células de outras fitobactérias. O desenvolvimento do microrganismo está restrito ao floema e à hemolinfa de insetos e sua reprodução ocorre, principalmente por fissão binária e gemulação (BERTACCINI & DUDUK, 2009).

As características bioquímicas das células em cultura pura ainda não foram obtidas, uma vez que os fitoplasmas são extremamente fastidiosos. Desta forma, a nomenclatura binomial utilizada para os seres vivos não é empregada para estes microrganismos. Técnicas moleculares têm permitido a sua identificação e classificação em grupos e subgrupos, os quais são representado por algarismos romanos e letras, respectivamente (BEDENDO, 2018; FIRRAO et al., 2004).

A disseminação natural é realizada por insetos vetores, com ênfase para as cigarrinhas, principalmente aquelas pertencentes à família Cicadellidae e algumas espécies de psílídeos

(BEDENDO,2018). A relação patógeno-vetor é do tipo persistente-propagativa, portanto o inseto uma vez que adquira o fitoplasma poderá, após um período de latência, transmiti-lo durante toda a sua vida. Experimentalmente, fitoplasmas podem ser transmitidos por enxertia, plantas parasitas do gênero *Cuscuta* e insetos vetores (BEDENDO, 2018; BERTACCINI & DUDUK, 2009; LEE et al., 2000).

A sintomatologia induzida por fitoplasmas é complexa, representada, geralmente, por um conjunto de distintos sintomas. As anormalidades relatadas no crescimento e desenvolvimento sugerem a ocorrência de intenso desbalanço hormonal (DAVIS, 1995). Sintomas típicos são caracterizados por clorose, superbrotamento de ramos, avermelhamento foliar, escurecimento dos vasos de floema e enfezamento ou nanismo. Contudo, o sintoma de filodia, desenvolvimento de folhas em órgãos florais, e virescência, presença de cor verde em órgãos não clorofilados, estão quase que exclusivamente associados a este tipo de patógeno (BEDENDO, 2018).

A diagnose é baseada na observação dos sintomas e na presença do patógeno no tecido do hospedeiro. A detecção do patógeno pode ser realizada de forma direta, pela observação de cortes ultrafinos de tecidos vegetais em microscópio eletrônico de transmissão, para visualização de corpúsculos pleomórficos no interior dos vasos do floema (BEDENDO, 2018). Indiretamente, a detecção pode ser realizada pela extração de DNA total da planta e aplicação da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) conduzida com ‘primers’ específicos para a região 16S rRNA do fitoplasma. O fragmento genômico amplificado pode ser sequenciado para fins de identificação e classificação, usando-se, para tanto, análise filogenética e análise virtual de RFPL (Restriction Fragment Length Polymorfism) (DAVIS, 1995; LEE et al., 2000).

As medidas de controle recomendadas para o manejo de doenças causadas por fitoplasmas consistem na inspeção de material vegetal, a fim de evitar a introdução do patógeno no país ou nas regiões onde não foi relatada a sua presença; utilização de material propagativo (ex.: bulbos, tubérculos, manivas) sadio; plantio de mudas de boa qualidade fitossanitária; erradicação de plantas doentes; controle dos insetos vetores; e utilização de genótipos resistentes ou tolerantes (BEDENDO, 2018; LEE et al., 2000).

### **2.3. Enfezamento vermelho do milho**

O enfezamento vermelho foi relatado no início da década de 70 e, naquela época, a doença foi considerada como sendo de importância secundária, embora já houvesse um alerta de grandes danos nos plantios instalados tardiamente. Com o crescimento das áreas de plantio

de milho “safrinha” (segunda safra), houve um aumento na importância do enfezamento, devido ao maior período da cultura no campo, conseqüentemente permanência da alta população do inseto vetor e aumento de plantas fontes de inóculo (KUMARI, et al., 2019; LEE et al., 2000; MASSOLA JÚNIOR, 2001; MONTANO et al., 2007).

A doença tem como agente causal um fitoplasma pertencente ao subgrupo 16Sr-I, um variante relacionado à espécie putativa '*Candidatus Phytoplasma asteris*' (LEE et al., 1998). Diversos estudos evidenciaram reduções significativas na produção da cultura decorrentes do enfezamento. Em condições controladas, foi observada a diminuição da produção de grãos da ordem de 91,3%, quando as plantas foram submetidas à inoculação por nove insetos infectantes (TOFFANELLI, 2001). No campo, sob infecção natural, foi observada a redução de 30% na produção em parcelas experimentais contrapostas a parcelas tratadas com inseticidas para o controle do vetor (MASSOLA JÚNIOR, 1999). Recentemente, surtos da doença tem ocorrido no país, como na safra 2015/16, com alta intensidade, sobretudo nas regiões produtoras de Goiás, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul e São Paulo (SABATO, 2017).

Várias espécies de cigarrinhas foram relatadas como vetoras deste fitopatógeno, entre elas *Dalbulus maidis*, *Dalbulus elimatus*, *Graminiella nigrofons*, *Baldulus tripsaci*. Estudos apontaram que a espécie *D. maidis*, pertencente à família Cicadellidae e conhecida como cigarrinha do milho, tem maior eficiência na transmissão, com variações entre 43,9 a 88,9% (LOPES & OLIVEIRA, 2004; MADDEN & NAULT, 1983, NAULT, 1980). Além do fitoplasma do enfezamento vermelho, *D. maidis* é capaz de transmitir outros dois patógenos, o *Spiroplasma kunkelii* e o *Maize rayado fino virus* (MRFV), agentes causais do enfezamento pálido e da virose da risca, respectivamente (SABATO, 2017). A relação entre o vetor e o fitoplasma é do tipo persistente propagativa (NAULT, 1980).

No processo de alimentação, o inseto adquire o patógeno juntamente com o conteúdo do floema de plantas infectadas. No trato digestivo, o fitoplasma é aderido e ultrapassa a barreira do epitélio do mesêntero, atingindo a hemocele, com posterior circulação e multiplicação em vários órgãos pelo fluxo da hemolinfa. Ao atingir as glândulas salivares, é incorporado à saliva para a inoculação em plantas sadias. O período mínimo de acesso à aquisição é de uma hora, após adquirir o patógeno o período de latência é de cerca de 23 dias, com variações conforme a temperatura. Depois disso, o período mínimo de acesso à inoculação é de duas horas (MADDEN & NAULT, 1983; NAULT, 1980).

As plantas sintomáticas podem exibir folhas com bordo e ápice cloróticos, com posterior avermelhamento, encurtamento de entrenós e conseqüentemente redução no crescimento, proliferação de pequenas espigas, formação de grãos imperfeitos, perfilhamento,

afinamento de colmo, florescimento precoce e sistema radicular reduzido. A severidade dos sintomas está relacionada à resistência do híbrido/variedade, fatores ambientais e estágio de desenvolvimento do hospedeiro na época de infecção (BEDENDO, 2018; OLIVEIRA & PAIVA, 2004).

O milho “safrinha” tem sido mais afetado pelo enfezamento do que o milho plantado em época tradicional, uma vez que a doença é favorecida por temperaturas elevadas e ocorrência de alta população do vetor, neste período de cultivo (BEDENDO, 2018; MASSOLA JÚNIOR, 1999). Uma das medidas recomendadas para o controle é evitar plantios tardios; no entanto, a prática de “safrinha” atualmente é responsável por maior parte da produção brasileira de grãos. O uso de genótipos resistentes tem sido a melhor estratégia no controle do enfezamento vermelho, assim como o controle de *D. maidis* com a utilização de inseticidas em tratamento de semente e pulverização (BEDENDO & LOPES, 2019).

#### **2.4. Uso de silício no manejo de doenças**

Os nutrientes essenciais têm influência na incidência e severidade das doenças. Apesar do silício não ser considerado um nutriente essencial, a sua relevância tem sido considerada pelo seu potencial na redução da intensidade de doenças em vários patossistemas. É o segundo elemento mais abundante no planeta e no solo é encontrado na forma de ácido monossilícico ( $H_4SiO_4$ ), sendo absorvido pelo sistema radicular. O silício é reconhecido como um elemento benéfico às plantas, uma vez que pode promover tolerância à seca, resistência à toxicidade e defesa contra pragas e doenças (POZZA et al., 2015).

Existem numerosos relatos do silício como um elemento associado à resistência de plantas a doenças. Inicialmente, as pesquisas foram voltadas para as monocotiledôneas e gramíneas acumuladoras deste nutriente, mas, posteriormente, resultados satisfatórios também foram encontrados em dicotiledôneas (POZZA et al., 2015). De acordo com Zanão Júnior (2009) a adubação do solo com silício foi capaz de reduzir em aproximadamente 55% a severidade da mancha marrom do arroz causado pelo fungo *Bipolaris oryzae*. Resultados semelhantes foram encontrados por Resende et al. (2013), e Naidoo et al. (2009) em plantas de sorgo com *Colletotrichum sublineolum* e cana-de-açúcar com *Puccinia melanocephala*, respectivamente.

O mecanismo de ação deste elemento possivelmente está associado à sua interação com o tecido do hospedeiro, propiciando impedimento físico ao desenvolvimento do patógeno, por meio de sua deposição nos tecidos vegetais (BARROS et al., 2010). Além disso, barreiras químicas podem ser formadas, aumento na produção de compostos fenólicos, fitoalexinas e

lignina e elevada atividade de enzimas relacionadas à defesa. A absorção do silício resulta em mudanças anatômicas nos tecidos vegetais, como células epidérmicas com a parede celular mais espessa devido à deposição de sílica. Desta forma, este elemento propicia melhor arquitetura às plantas, aumentando a capacidade fotossintética e a resistência aos patógenos (ZAMBOLIM et al., 2012; ZAMBOLIM & ZANÃO JÚNIOR, 2012).

Alguns trabalhos relataram efeitos positivos da adubação com silício no cultivo do milho e nos componentes de produção. Segundo Teodoro et al. (2014), maior comprimento de espigas foi obtido em plantas com a aplicação foliar deste elemento. Os dados de Sousa et al. (2010) mostraram aumento na massa de mil grãos para plantas fertilizadas com silício. Evidências sugerem que a deposição deste nutriente pode promover a resistência de plantas a insetos, pela formação de barreiras físicas, químicas e bioquímicas (LIANG, et al., 2015). Como relatado por Korndörfer et al. (2011), a aplicação de silício resultou em aumento da mortalidade de ninfas, propiciou maior duração do estágio ninfal e menor longevidade da cigarrinha *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. Os diversos trabalhos, portanto, têm mostrado o potencial de uso deste elemento para minimizar os danos provocados tanto por insetos como por agentes causais de doenças.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi realizada no período de janeiro a novembro de 2020. Os ensaios foram conduzidos em campo e casa de vegetação, situados na área experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (LFN/ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP), no município de Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil, cujas coordenadas geográficas são: 22°42’28” de latitude sul, 47°37’50” de longitude oeste e altitude média de 552 metros.

#### **3.1. Obtenção de populações infectantes e não infectantes de cigarrinhas**

As cigarrinhas infectantes e não infectantes foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, pertencente ao Departamento de Entomologia da ESALQ/USP.

As colônias de cigarrinhas foram mantidas, em casa de vegetação, em gaiolas teladas com dimensões de 60x30x30 cm, como descrito por Oliveira et al. (2017). Para obtenção da população infectante, as cigarrinhas foram submetidas à alimentação em plantas de milho comprovadamente portadoras de fitoplasmas. O período de acesso à aquisição (PAA) foi de quatro dias. Em seguida, os insetos foram transferidos para plantas sadias de milho, onde permaneceram por 21 dias, durante o período de latência (PL). As cigarrinhas infectantes foram utilizadas para a transmissão do fitoplasma para plantas de milho, tanto nos experimentos de campo como casa de vegetação.

#### **3.2. Uso de silício em plantas de milho crescidas no campo**

O solo foi preparado com auxílio de grade aradora e niveladora. Sementes do híbrido MG600 (Morgan Sementes®) foram usadas nos ensaios. A semeadura foi feita em sulcos, previamente adubados de acordo com o tratamento a ser empregado, a uma profundidade de três a cinco cm, com espaçamento entre linhas de 50 cm e entre plantas de 20 cm. A adubação mineral de nitrogênio, fósforo e potássio foi preparada de acordo com análise de solo e baseada no estudo de nutrição da cultura do milho desenvolvido por Coelho (2006). Como fonte de silício foi utilizado um produto comercial com recomendação do fabricante para a cultura ( $P_2O_5$  total: 5,4%;  $P_2O_5$  solúvel em ácido cítrico: 1,62%; Cálcio: 5,6%; Magnésio: 4,8%; Silício teor total: 8,0%).

Os seguintes tratamentos fizeram parte do ensaio: SISO-I (silício via solo + cigarrinha infectante); SISO-NI (silício via solo + cigarrinha não infectante); SISO-A (silício via solo + não confinamento da cigarrinha); SIFO-I (silício via foliar + cigarrinha infectante); SIFO-NI (silício via foliar + cigarrinha não infectante); SIFO-A (silício via foliar + não confinamento da cigarrinha); MISTO-I (silício via solo e foliar + cigarrinha infectante); MISTO-NI (silício via solo e foliar + cigarrinha não infectante); MISTO-A (silício via solo e foliar + não confinamento da cigarrinha); Controle-I (ausência de silício + cigarrinha infectante); Controle-NI (ausência de silício + cigarrinha não infectante) e Controle-A (ausência de silício + não confinamento da cigarrinha). O delineamento experimental adotado foi blocos casualizados (DBC) no esquema fatorial 4x3 com seis repetições (cada planta representa uma repetição), totalizando 144 plantas.

As plantas foram abrigadas em gaiolas de tecido do tipo “voil” branco, com dimensões de 2,5x1,0x1,0 m. Este procedimento foi adotado para evitar a transmissão do patógeno por cigarrinhas presentes no campo e o ataque de outras pragas da cultura, como lagartas. Foram realizadas duas adubações de cobertura, a primeira com as plantas com seis a oito folhas e a segunda, 15 a 20 dias após a primeira cobertura. As plantas foram conduzidas até o estágio produtivo para avaliação das variáveis de crescimento e produção.

### **3.3. Uso de silício em plantas de milho em casa de vegetação**

Para o ensaio em casa de vegetação, duas sementes do híbrido MG600 foram semeadas em sacos plásticos (35 cm x 45 cm x 25 cm), contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica, previamente esterilizada em autoclave. Após a emergência, foi realizado o desbaste e foi mantida uma plântula por saco plástico. A adubação mineral de nitrogênio, fósforo e potássio foi adotada com base no estudo de nutrição da cultura do milho desenvolvido por Coelho (2006). A fonte de silício utilizada foi o mesmo produto comercial aplicado no ensaio de campo.

Os seguintes tratamentos fizeram parte do experimento: SISO-I (silício via solo + cigarrinha infectante); SISO-NI (silício via solo + cigarrinha não infectante); SISO-A (silício via solo + não confinamento da cigarrinha); SIFO-I (silício via foliar + cigarrinha infectante); SIFO-NI (silício via foliar + cigarrinha não infectante); SIFO-A (silício via foliar + não confinamento da cigarrinha); MISTO-I (silício via solo e foliar + cigarrinha infectante); MISTO-NI (silício via solo e foliar + cigarrinha não infectante); MISTO-A (silício via solo e foliar + não confinamento da cigarrinha); Controle-I (ausência de silício + cigarrinha infectante); Controle-NI (ausência de silício + cigarrinha não infectante) e Controle-A (ausência de silício + não confinamento da cigarrinha). O delineamento experimental adotado foi

inteiramente casualizado (DIC) no esquema fatorial 4x3 com seis repetições (cada planta representa uma repetição), totalizando 72 plantas.

Igualmente ao ensaio em campo, foram realizadas duas adubações de cobertura, a primeira com as plantas com seis a oito folhas e a segunda, 15 a 20 dias após a primeira cobertura. As plantas foram conduzidas até o estágio produtivo para avaliação das variáveis de crescimento e produção.

### **3.4. Aplicação da fonte de silício e inoculação experimental**

A aplicação da fonte de silício foi realizada no sulco de plantio e/ou pulverização. No plantio, foi utilizado 1 g do produto comercial por cova ou saco plástico. A calda para aplicação foliar em campo e casa de vegetação foi preparada com a diluição de 1,5 g do produto comercial por litro de água. Aos oito dias após o plantio, foi realizada a aplicação da calda, com o auxílio de um pulverizador, até o ponto de escorrimento.

A inoculação experimental foi realizada em plantas com três a quatro folhas (10 dias após o plantio). Oito cigarrinhas foram confinadas por planta, utilizando-se gaiolas de acetato transparente (29,7 cm de altura e 10,5 de diâmetro) por um período de acesso à inoculação (PAI) de quatro dias. Em seguida, as cigarrinhas foram coletadas e armazenadas a -80°C para detecção do fitoplasma. Após o PAI as plantas foram pulverizadas com o inseticida Karate Zeon® para evitar a eclosão dos ovos resultantes da postura ao longo do período de acesso à inoculação.

### **3.5. Coleta de dados e colheita das espigas**

Quando as plantas apresentaram as espigas no estágio de grão pastoso, foram obtidos os dados de altura de plantas (cm), diâmetro de colmo (mm) e número de espigas por planta. Também neste estágio de desenvolvimento, no ensaio de campo, foram amostradas folhas do terço superior das plantas para detecção molecular do patógeno por meio de PCR. No ensaio realizado em casa de vegetação, além de amostras de folhas do terço superior, foi realizada a coleta de folhas do terço inferior e da raiz, visando à detecção do patógeno.

A colheita das espigas foi realizada quando os grãos apresentavam umidade recomendada, em torno de 14%. A produção de cada planta foi individualizada e identificada para a avaliação das variáveis de produção. Foi realizado o peso total de grãos (g), comprimento (cm), diâmetro (mm) e número de fileiras de grãos nas espigas.

### 3.6. Extração, quantificação e padronização do DNA total de plantas

Para a detecção molecular do fitoplasma foi realizada a extração de DNA total do tecido vegetal pela metodologia proposta por Doyle & Doyle (1987). Uma amostra de 2 g de tecido foliar foi macerada em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana e colocada em microtubo de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 800 µL de tampão de extração 2X CTAB (2g de CTAB, 8,18 g de NaCl, 0,74 g EDTA, 1,5g Tris HCL, 100 mL de água, pH 8,0) aquecido em banho-maria a 65°C. A amostra foi homogeneizada em agitador do tipo vortex e mantida em banho-maria a 65°C por 60 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Após o período de incubação foram adicionados 600 µL de clorofórmio isoamil (CIA - 24(clorofórmio):1(isoamil)) e a mistura foi agitada em vortex e centrifugada por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e adicionado a um novo microtubo de 1,5 mL acrescido de 540 µL de isopropanol a -20°C. O conteúdo do microtubo foi gentilmente misturado para precipitação dos ácidos nucleicos e mantido por 12 horas (uma noite) a -20°C. Após este período, a amostra foi submetida à centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado, mantendo-se o precipitado. Este precipitado foi lavado duas vezes com etanol 80% por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de cloreto de sódio (NaCl 1M) para dissolver a fase sólida e a mistura foi mantida a 4°C por 60 minutos. Logo após, foi realizada uma centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante coletado para um novo microtubo, onde foram adicionados 350 µL de isopropanol a -20°C. A amostra foi incubada por 2 horas a -20°C com posterior centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm e descarte do sobrenadante. O precipitado formado foi novamente lavado duas vezes com etanol 80% por 5 minutos. Depois de descartar o etanol, o precipitado foi mantido a temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, o precipitado foi ressuscitado em 100 µL de água deionizada (Milli-Q) e armazenado a -20°C para utilização nas reações de PCR. A avaliação da qualidade e a quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop® 2000 Thermo Scientific. Todas as amostras de DNA foram padronizadas para a concentração de 50 ng/µL.

### 3.7. Extração do DNA total de cigarrinhas

O DNA total das cigarrinhas foi extraído com metodologia adaptada de Doyle & Doyle (1987). As cigarrinhas foram maceradas em microtubo de 1,5 mL contendo 150 µL de tampão de extração 2X CTAB (2g de CTAB, 8,18 g de NaCl, 0,74 g EDTA, 1,5g Tris HCL, 100 mL de água, pH 8,0). Posteriormente, a amostra foi incubada em banho-maria a 65°C por 5 minutos. Após o período de incubação foram adicionados 150 µL de clorofórmio isoamil (CIA -

24(clorofórmio):1(isoamil)) e a mistura foi agitada em vortex e centrifugada por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e adicionado a um novo microtubo de 1,5 mL acrescido de 100 µL de isopropanol a -20°C. O conteúdo do microtubo foi gentilmente misturado para precipitação dos ácidos nucléicos e mantido por 1 hora a -20°C. Após este período, a amostra foi submetida à centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado, mantendo-se o precipitado. Este precipitado foi lavado com etanol 80% por 5 minutos. A amostra foi submetida à centrifugação por 3 minutos a 14.000 rpm e depois de descartar o etanol, o precipitado foi mantido a temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso em 20 µL de água deionizada (Milli-Q) e armazenado a -20°C para utilização nas reações de PCR.

### **3.8. Detecção do fitoplasma por “nested”-PCR**

Uma alíquota da amostra foi submetida ao teste de “nested”-PCR conforme descrito por Gundersen e Lee (1996), utilizando-se os pares de primers universais: R16mF2 (5'-CAT GCA AGT CGA ACG GA-3') e R1 (5'-CTT AAC CCC AAT CAT CGA C-3'), seguido de R16F2n (5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3') e R2 (5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'). A mistura de reação foi constituída por 1 µL de DNA, 5 µL de tampão 10X (Promega®), 4 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µL dNTP, 0,6 µL de cada primer, 0,1 µL Taq DNA polimerase e água Milli-Q para um volume final de 25 µL. As reações de PCR foram processadas em termociclador (Techne Prime®) ajustado para as seguintes etapas: 94°C durante 2 minutos; 94°C durante 1 minuto, 52°C durante 2 minutos e 72°C durante 3 minutos por 35 ciclos; 72°C durante 7 minutos. Os produtos amplificados por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo o corante Sybr safe® (GUNDERSON & LEE, 1996). O marcador 1Kb DNA “Ladder” RTU (GeneDirex®) foi adotado como padrão de massa molecular. Os fragmentos genômicos amplificados foram observados em transluminador de luz ultravioleta.

### **3.9. Quantificação do patógeno em tecido vegetal**

Uma curva padrão de diluição de DNA para o patógeno foi construída, visando relacionar os valores de Ct (‘Cycle Threshold’) das reações de qPCR com as diferentes concentrações de DNA puro do patógeno. O estoque para a obtenção da curva padrão foi preparado contendo 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng de DNA do patógeno por reação. Os valores de Ct foram transformados em número de cópias de fitoplasma por 100 ng de DNA

total. O número de cópias do fitoplasma foi calculado utilizando a fórmula: Número de cópias = [concentração de DNA do plasmídeo (g/μL)] / [(tamanho do clone em pb x peso médio de 1pb DNA) x unidade de massa atômica (g/u)]. (BARIC et al., 2011; APPLIED BIOSYSTEMS, 2009). Desta forma, foi construída uma curva padrão que relaciona esses diferentes valores de números de cópias do fitoplasma com seus respectivos valores de Ct.

O patógeno foi quantificado por meio da técnica de PCR quantitativo (qPCR). As amostras foram coletadas quando as plantas estavam no estágio de grão leitoso. O material vegetal foi obtido da última folha completamente expandida de cada planta inoculada com o patógeno. O DNA total das amostras foi extraído seguindo o protocolo CTAB, descrito por Doyle & Doyle (1987). Nas reações de amplificação foram empregados os “primers” uniRNAF (5' AAA TAT AGT GGA GGT TAT CAG GGA TAC AG 3') e uniRNAR (5' AAC CTA ACA TCT CAC GAC ACG AAC T 3') (HREN et al., 2007).

Estas reações foram conduzidas em placas de 96 poços, em termociclador 7500 FAST (Applied Biosystems®). Foi utilizado o Kit Platinum SYBR® GREEN qPCR SUPER MIX UDG – Invitrogen. Cada 25 μL de reação foi constituída por 100 ng de DNA vegetal (2 μL de DNA diluído), 12,5 μL de Supermix (1X), 0,5 μL de cada primer, 0,5 μL de ROX (1:10) e 9 μL de água mili-Q autoclavada. Para amplificação do DNA do fitoplasma, o termociclador foi ajustado para as seguintes etapas: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O DNA extraído de planta sadia de milho e a água representaram os controles negativos. As reações foram realizadas em triplicatas técnicas em uma mesma placa.

### **3.10. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no Software R, versão 4.1.0. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

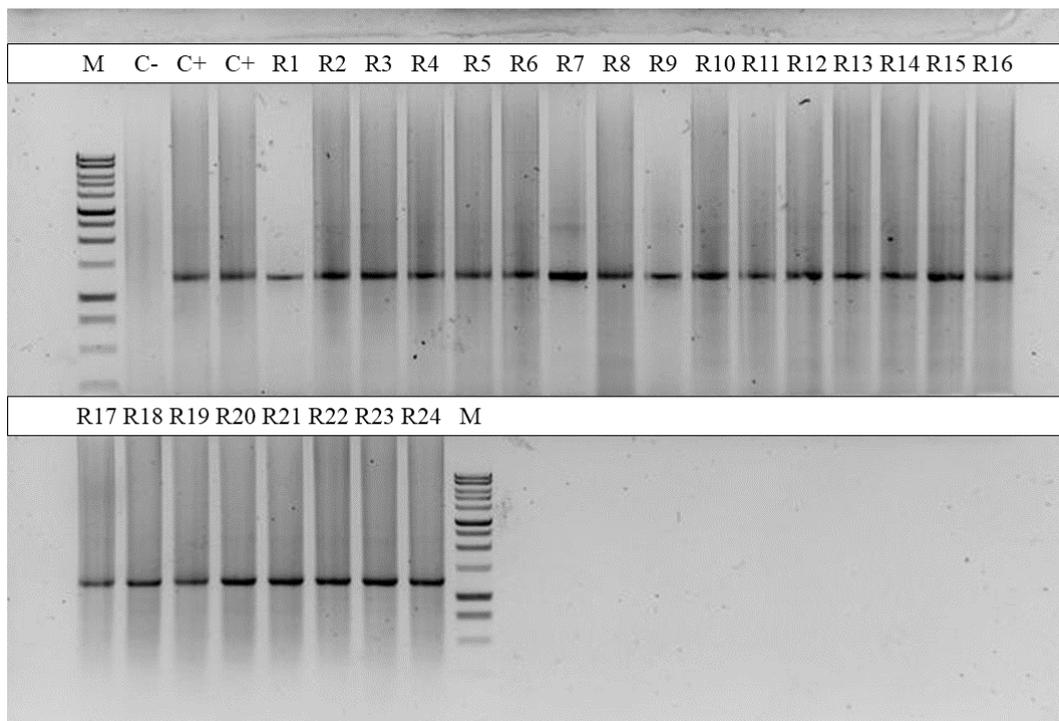
### 4.1. Detecção do fitoplasma

No experimento conduzido em campo, a presença de fitoplasma não foi detectada nas plantas submetidas à alimentação de cigarrinhas infectantes. Fragmentos genômicos, no entanto, foram amplificados a partir do padrão positivo representado por plantas que receberam o tratamento ausência de silício + cigarrinha infectante. Embora não tenha sido detectado o fitoplasma, foi observado que as plantas inoculadas apresentavam subdesenvolvimento, quando comparadas àquelas não inoculadas. Ressalta-se que a presença de fitoplasma foi confirmada nas cigarrinhas usadas para a inoculação das plantas de milho.

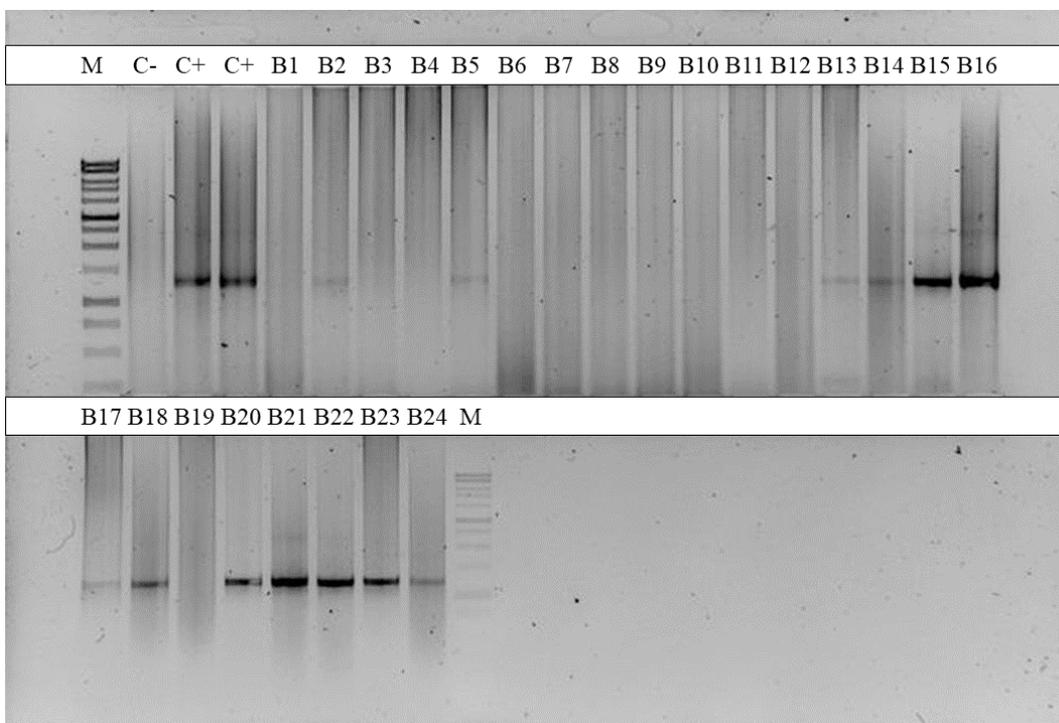
No ensaio de casa de vegetação, o fitoplasma foi detectado em todas as plantas inoculadas, quando se utilizou DNA total extraído de raízes (Figura 1). Nas amostras de folhas obtidas do terço inferior (Figura 2) e superior das plantas inoculadas (Figura 3), foi possível detectar o fitoplasma em parte, e não na totalidade, das plantas submetidas ao PCR. Assim, quando raízes foram analisadas, fitoplasma foi encontrado em 100% das plantas; amostragem de folhas provenientes do terço inferior permitiu a detecção de fitoplasma em 54,2% das plantas; e extrações feitas de folhas do terço superior, evidenciaram a presença de fitoplasma em 20,8% das plantas inoculadas (Tabela 1). Como no ensaio de campo, a presença de fitoplasma foi detectada nos insetos empregados para a inoculação das plantas de milho.

**Tabela 1.** Detecção do fitoplasma do enfezamento do milho em plantas componentes do experimento em casa de vegetação e submetidas à alimentação por cigarrinhas infectantes em amostras de raiz, folhas do terço inferior e folhas do terço superior.

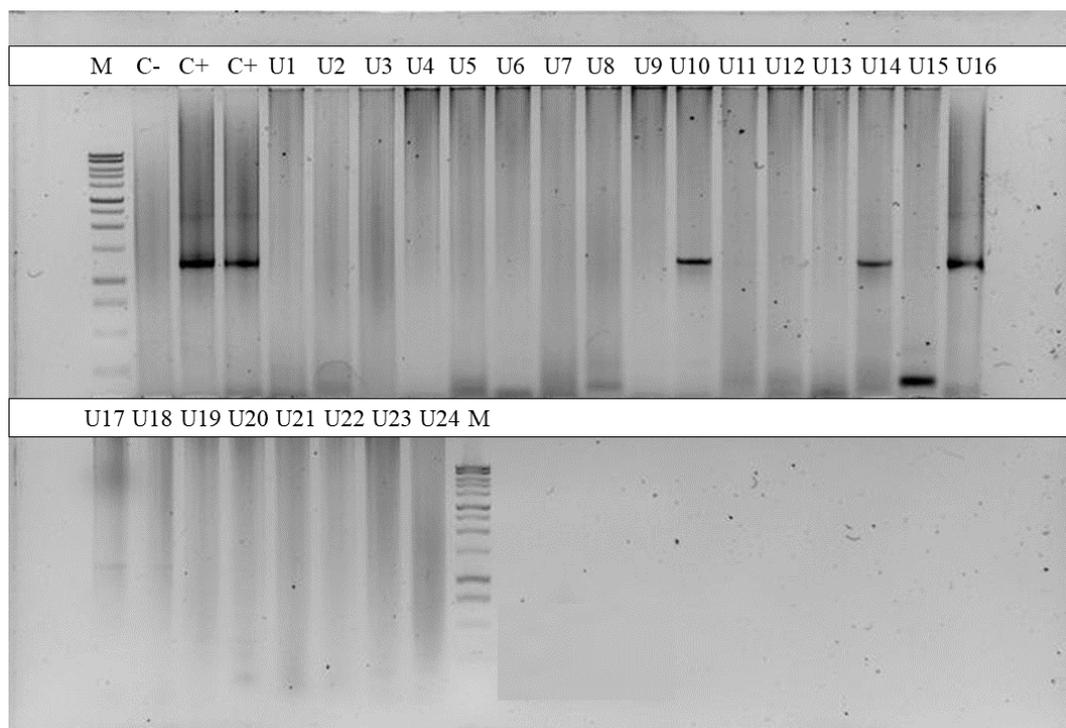
Tratamento	Detecção		
	Nº de plantas infectadas/Nº de plantas inoculadas (% de infecção)		
	Raiz	Terço inferior	Terço superior
<b>Controle</b>	6/6 (100)	2/6 (33,3)	0/6 (0,0)
<b>SISO</b>	6/6 (100)	0/6 (0,0)	1/6 (16,7)
<b>SIFO</b>	6/6 (100)	6/6 (100)	4/6 (66,7)
<b>MISTO</b>	6/6 (100)	5/6 (83,3)	0/6 (0,0)
<b>Total</b>	24/24 (100)	13/24 (54,2)	5/24 (20,8)



**Figura 1.** Detecção do fitoplasma do enfezamento do milho em amostras de raiz coletadas de plantas componentes do experimento em casa de vegetação e submetidas à alimentação por cigarrinhas infectantes. M= marcador molecular 1Kb DNA “Ladder”; C-= controle negativo; C+= controle positivo; R1 a R6= amostras de raiz de plantas inoculadas; R7 a R12= amostras de raiz de plantas inoculadas tratadas com silício aplicado no solo; R13 a R18= amostras de raiz de plantas inoculadas tratadas com silício aplicado via foliar; R19 a R24= amostras de raiz de plantas inoculadas tratadas com silício aplicado no solo e via foliar.



**Figura 2.** Detecção do fitoplasma do enfezamento do milho em amostras de folhas do terço inferior de plantas componentes do experimento em casa de vegetação e submetidas à alimentação por cigarrinhas infectantes. M= marcador molecular 1Kb DNA “Ladder”; C-= controle negativo; C+= controle positivo; B1 a B6= amostras de folhas de plantas inoculadas; B7 a B12= amostras de folhas de plantas inoculadas, com silício aplicado no solo; B13 a B18= amostras de folhas de plantas inoculadas, com silício aplicado via foliar; B19 a B24= amostras de folhas de plantas inoculadas, com silício no solo e via foliar.



**Figura 3.** Detecção do fitoplasma do enfezamento do milho em amostras de folhas do terço superior de plantas componentes do experimento em casa de vegetação e submetidas à alimentação por cigarrinhas infectantes. M= marcador molecular 1Kb DNA “Ladder”; C-= controle negativo; C+= controle positivo; U1 a U6= amostras de folhas de plantas inoculadas; U7 a U12= amostras de folhas de plantas inoculadas, com silício no solo; U13 a U18= amostras de folhas de plantas inoculadas, com silício aplicado via foliar; U19 a U24= amostras de raiz de plantas inoculadas, com silício aplicado no solo e via foliar.

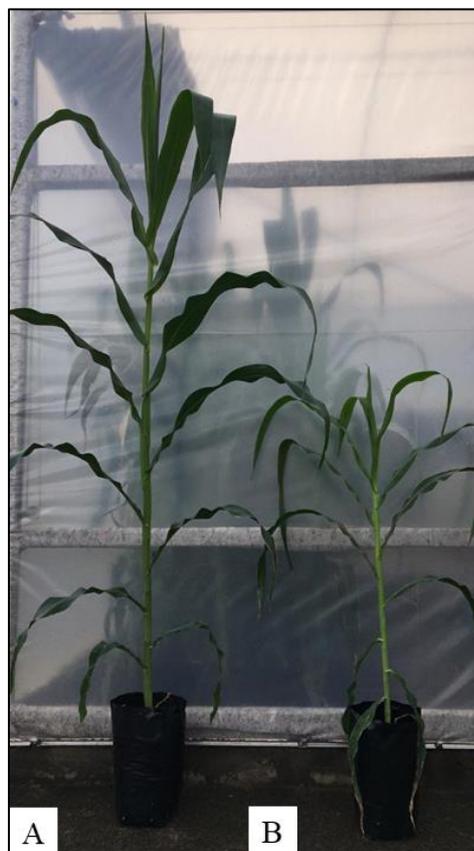
Apesar da alta sensibilidade, os ensaios de PCR geraram resultados negativos para parte das plantas analisadas com base na extração de DNA de folhas. O menor sucesso na detecção do fitoplasma em tecidos da parte aérea, quando comparado com tecido de raiz, pode ser atribuído principalmente a dois fatores (LEE et al., 1994). Um deles, à baixa concentração do fitoplasma no tecido foliar e maior concentração do mesmo nos tecidos radiculares, desde que a concentração é variável de acordo com o órgão da planta. Outro fator está relacionado à distribuição irregular do patógeno na parte aérea, embora os fitoplasmas apresentem colonização sistêmica dos tecidos do hospedeiro. Portanto, a não detecção de fitoplasma nos tecidos foliares de todas as plantas analisadas não necessariamente significa que este patógeno estivesse ausente nestas plantas inoculadas. Os resultados baseados na detecção do fitoplasma nas raízes são robustos e revelaram, portanto, que a aplicação de silício não foi eficiente para reduzir a incidência de plantas doentes.

#### 4.2. Sintomatologia das plantas

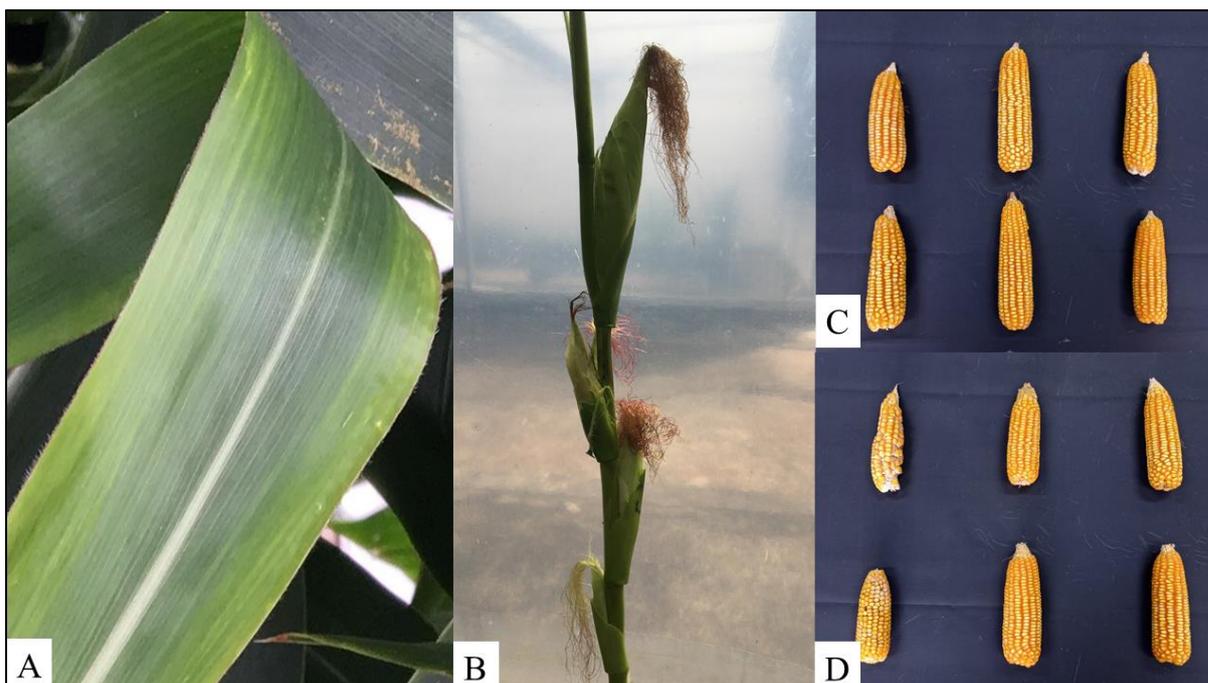
As plantas de milho conduzidas em campo, submetidas à alimentação por cigarrinhas infectantes, apresentaram os primeiros sintomas entre 30 e 40 dias após o período de acesso à

inoculação. A sintomatologia foi caracterizada por redução da altura de plantas, por leve clorose nos bordos das folhas, proliferação de espigas e diminuição no tamanho de espigas. Embora fossem observados sintomas característicos da doença, não foi possível detectar o patógeno nas plantas inoculadas, como já mencionado anteriormente. Os sintomas ocorreram de forma semelhante em plantas com tratamento com silício aplicado no solo e/ou via foliar quando comparadas as plantas controle. Estes resultados evidenciaram o uso do silício não foi eficiente para inibir o aparecimento de sintomas nas plantas.

Sintomas similares àqueles observados nas plantas inoculadas presentes no experimento de campo foram exibidos pelas plantas componentes do ensaio conduzido em casa de vegetação. No decorrer do ciclo da cultura, foi possível observar a redução no tamanho das plantas infectadas (Figura 4), além de clorose nos bordos das folhas, proliferação de espigas e leve redução no tamanho de espigas (Figura 5). Estes sintomas são frequentemente observados em plantas de milho portadoras do fitoplasma do enfezamento vermelho, como relatado pela vasta bibliografia existente sobre o assunto pesquisado (SABATO & OLIVEIRA, 2017). Assim como evidenciado no experimento de campo, a aplicação de silício não se mostrou efetivo para inibir os sintomas induzidos pelo fitoplasma nas plantas inoculadas.



**Figura 4.** Efeito da inoculação de fitoplasma em plantas de milho componentes do ensaio conduzido em casa de vegetação. A – Planta submetida à alimentação de cigarrinhas não infectantes. B – Planta submetida à alimentação de cigarrinhas infectantes.



**Figura 5.** Expressão de sintomas por plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento no ensaio conduzido em casa de vegetação. A – Lâmina foliar apresentando clorose inicial nos bordos. B – Proliferação de espigas. C – Padrão de espigas produzidas por plantas saudáveis. D – Padrão de espigas produzidas por plantas infectadas.

### 4.3. Componentes de produção

#### 4.3.1. Altura de plantas

Plantas de milho conduzidas em campo e submetidas à alimentação por cigarrinhas infectantes apresentaram altura significativamente inferior, comparada às plantas submetidas à alimentação por cigarrinhas não infectantes ou com a ausência de cigarrinhas. Os menores valores observados para altura de plantas infectadas foram no tratamento controle e misto. Plantas de milho, com silício aplicado no solo, submetidas à alimentação de insetos saudáveis e ausência de insetos confinados e plantas de milho com silício aplicado via foliar e ausência de insetos confinados apresentaram as maiores médias para alturas de plantas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Altura de plantas (cm) de milho componentes do experimento de campo e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle	201,50 b B	229,00 c A	237,83 b A
SISO	228,50 a B	254,92 a A	259,00 a A
SIFO	224,17 a C	237,58 bc B	252,42 a A
Misto	211,58 b C	244,58 ab A	227,58 b B

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

No experimento conduzido em casa de vegetação, os resultados foram semelhantes àqueles observados no ensaio instalado no campo. As plantas submetidas à alimentação de cigarrinhas infectantes, independentemente do tratamento, apresentaram redução significativa na altura de plantas (Tabela 3). No entanto, em contraste com o experimento conduzido em campo, os tratamentos utilizando silício via solo e/ou foliar não foram capazes de promover efeito significativo na altura de plantas (Tabela 4).

**Tabela 3.** Altura de plantas (cm) de milho componentes do experimento em casa de vegetação e submetidas à alimentação com insetos infectantes, sadios e não submetidas à alimentação de insetos.

Inseto	Altura de plantas (cm)
Infectante	151,00 b
Sadio	167,00 a
Ausente	169,00 a

Médias de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

**Tabela 4.** Altura de plantas (cm) de milho componentes do experimento em casa de vegetação e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle	154,17	176,17	167,67
SISO	149,33	160,67	171,00
SIFO	155,33	164,50	166,17
Misto	144,33	166,67	171,83

O silício vem ganhando espaço e tem sido utilizado pelos produtores em diversas culturas. Há um número abundante de relatos sobre os benefícios da utilização deste elemento

na agricultura. Rodrigues et al. (2019) avaliaram a aplicação de silício via recobrimento de sementes e via foliar sobre os componentes de produção do milho safrinha. Estes autores relataram que não foi observado efeito do uso de silício na altura das plantas, independentemente da forma de aplicação. O silício tem sido objeto de estudo para minimizar os efeitos de estresses de diferentes naturezas (SILVA et al., 2020). De acordo com Marques et al. (2021), o silício promoveu um aumento de 37% na altura de plantas cultivadas sob condições de estresse hídrico. Nas condições do presente estudo, embora o silício aplicado no solo ou via foliar tenha ocasionado um aumento na altura de plantas infectadas no campo, este resultado não foi observado em casa de vegetação. Além disso, o tratamento de plantas com silício aplicado no solo e via foliar (misto) em campo, não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento controle. Resultados semelhantes foram observados em trabalho realizado por Sandim et al. (2010), no qual tratamento de plantas com diferentes doses de silício não apresentaram respostas em relação à altura de plantas de milho.

#### 4.3.2. Diâmetro de colmo

No experimento conduzido em campo, não foram coletados dados de diâmetro de colmo. Em casa de vegetação, as plantas de milho submetidas à alimentação de insetos infectantes, sadios e plantas livres de insetos, porém tratadas com silício aplicado ao solo e/ou via foliar não apresentaram diferenças significativas quanto ao diâmetro de colmo (Tabela 5). Estes dados são concordantes com resultados obtidos por Rodrigues et al. (2019), os quais revelaram que plantas de milho não inoculadas com patógeno e tratadas com silício aplicado como recobrimento de semente e via foliar, não apresentaram médias de diâmetro de colmo significativamente diferente de plantas controle que não receberam o tratamento com silício.

**Tabela 5.** Diâmetro de colmo (mm) de milho componentes do experimento em casa de vegetação e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

<b>Tratamento</b>	<b>Inseto</b>		
	<b>Infectante</b>	<b>Sadio</b>	<b>Ausente</b>
<b>Controle</b>	18,43	18,36	19,81
<b>SISO</b>	17,69	17,44	21,18
<b>SIFO</b>	19,11	16,65	18,64
<b>Misto</b>	16,45	16,24	17,16

### 4.3.3. Número de espigas por planta

Nos experimentos realizados em campo e casa de vegetação, foi possível observar uma tendência no aumento do número de espigas produzidas pelas plantas infectadas com fitoplasma (Tabelas 6 e 7). Contudo, não houve diferenças significativas relacionadas ao número de espigas por planta associado às variáveis insetos e tratamentos com silício.

**Tabela 6.** Número de espigas produzidas por planta de milho componentes do experimento de campo e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle	1,58	1,08	1,17
SISO	1,58	1,17	1,17
SIFO	1,33	1,17	1,00
Misto	1,58	1,25	1,25

**Tabela 7.** Número de espigas produzidas por planta de milho componentes do experimento em casa de vegetação e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle	1,67	1,17	1,00
SISO	1,00	1,00	1,00
SIFO	1,00	1,00	1,00
Misto	1,17	1,33	1,00

Os resultados revelados pela presente pesquisa são concordantes com aqueles reportados por Almeida (2020), os quais demonstraram não haver diferença significativa quanto ao número de espigas produzidas plantas inoculadas e não inoculadas pelo fitoplasma. Em contraste, Toffanelli & Bedendo (2002), relataram aumento significativo no número de espigas por plantas inoculadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho. Os referidos autores citaram que plantas submetidas à alimentação de nove insetos infectantes apresentaram em média 4,5 espigas por planta, sendo as mesmas de tamanho reduzido e malformadas.

#### 4.3.4. Comprimento e diâmetro de espiga

Tanto no ensaio de campo como naquele instalado em casa de vegetação não houve diferenças significativas quanto ao comprimento e diâmetro de espigas produzidas por plantas inoculadas e não inoculadas (Tabelas 8, 9, 10 e 11). Os tratamentos com silício aplicado ao solo e/ou via foliar não promoveram um incremento no tamanho e diâmetro das espigas geradas pelas plantas tratadas, seja no experimento de campo, seja no ensaio de casa de vegetação.

**Tabela 8.** Comprimento de espigas (cm) geradas por plantas de milho componentes do experimento de campo e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle	18,45	18,67	18,70
SISO	17,46	17,12	17,55
SIFO	17,29	18,50	17,87
Misto	17,29	19,00	17,62

**Tabela 9.** Comprimento de espigas (cm) geradas por plantas de milho componentes do experimento em casa de vegetação e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle	13,33	14,75	14,16
SISO	13,91	15,83	15,83
SIFO	13,90	14,17	14,33
Misto	13,90	14,70	14,00

**Tabela 10.** Diâmetro de espigas (mm) geradas por plantas de milho componentes do experimento de campo e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle	50,50	52,00	52,00
SISO	50,80	47,30	48,90
SIFO	47,20	49,20	47,70
Misto	49,10	50,20	50,30

**Tabela 11.** Diâmetro de espigas (mm) geradas por plantas de milho componentes do experimento em casa de vegetação e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle	39,59	41,57	43,50
SISO	40,52	43,18	42,61
SIFO	39,42	40,33	40,30
Misto	39,90	40,33	41,80

Os tratamentos adotados neste estudo não apresentaram efeito positivo ou negativo, em termos estatísticos, sobre o tamanho e o diâmetro de espigas. Quanto ao uso de silício, investigações realizadas por Lourenço et al. (2017) demonstraram um aumento significativo no comprimento de espigas quando este nutriente foi aplicado na dose de 900 kg.ha<sup>-1</sup>, na forma de silicato de cálcio e magnésio. Apesar disso, não houve um efeito positivo deste elemento no diâmetro de espigas. Ainda, um trabalho conduzido por Rodrigues et al. (2019) não mostrou resultados positivos para o parâmetro diâmetro de espigas, quando o silício foi usado no recobrimento de sementes e aplicação foliar. Em relação à infecção por fitoplasma, Toffanelli & Bedendo (2002) relataram uma redução significativa no tamanho de espigas provenientes de plantas infectadas pelo patógeno. Neste caso, foram observadas reduções de até 70,3% no tamanho de espigas produzidas pelas plantas inoculadas em comparação com plantas não inoculadas. Almeida (2020) também relatou redução no tamanho de espigas geradas por plantas experimentalmente infectadas por fitoplasma. Este mesmo autor também observou que o diâmetro de espigas foi afetado negativamente em plantas inoculadas pelo patógeno.

#### 4.3.5. Número de fileiras de grãos por espiga

O número de fileiras de grãos por espiga tem sido outro componente de produção utilizado como parâmetro nos trabalhos envolvendo a cultura do milho. Em ambos os experimentos realizados não foram observadas diferenças significativas no número de fileiras de grãos por espiga em plantas inoculadas ou não inoculadas e tratadas ou não tratadas com silício, no forma de aplicação no solo e/ou via foliar (Tabelas 12 e 13).

**Tabela 12.** Número de fileiras de grãos/espiga produzida por plantas de milho componentes do experimento de campo e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
<b>Controle</b>	15,50	15,17	15,75
<b>SISO</b>	16,00	15,50	15,42
<b>SIFO</b>	14,83	14,75	13,75
<b>Misto</b>	14,67	15,17	15,25

**Tabela 13.** Número de fileiras de grãos/espiga produzida por plantas de milho componentes do experimento em casa de vegetação e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
<b>Controle</b>	12,67	14,00	14,33
<b>SISO</b>	12,50	13,67	12,67
<b>SIFO</b>	12,80	12,33	12,67
<b>Misto</b>	13,60	13,20	13,67

Contrariamente ao observado neste trabalho, Toffanelli & Bedendo (2002), relataram que plantas de milho inoculadas com fitoplasma apresentaram redução de até 50% no número de fileiras de grãos/espiga, em relação às plantas não inoculadas. Como consequência, um número reduzido de grãos por espiga foi encontrado em plantas submetidas à inoculação do patógeno. Quanto à utilização de silício, um incremento no número de fileiras de grãos/ espiga foi relatado por Rodrigues et al. (2019) em plantas livres de infecção por fitoplasma, quando este nutriente foi usado na dose de 12,83 g/kg de sementes.

#### 4.3.6. Peso total de grãos por planta

No experimento conduzido em campo não foi observada interação significativa das variáveis representadas por inseto e tratamento com silício, tanto aplicado ao solo e/ou via foliar, para peso total de grãos/planta (Tabela 14). No entanto, foi observada redução significativa no peso total de grãos/planta em plantas infectadas por fitoplasma comparado às plantas não infectadas (Tabela 15).

**Tabela 14.** Peso total de grãos/planta (g) em plantas de milho componentes do experimento de campo e submetidos à alimentação com inseto infectante, sadio ou ausente nos tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle	184,14	230,30	208,49
SISO	121,31	145,49	204,80
SIFO	133,52	150,81	193,65
Misto	147,81	200,16	216,83

**Tabela 15.** Peso total de grãos/planta (g) em plantas de milho componentes do experimento de campo e submetidas à alimentação de insetos infectantes (I), sadios (S) e plantas não submetidas à alimentação de insetos (ausente) (A).

Inseto	Peso total de grãos/planta (g)
Infectante	146,69 c
Sadio	181,69 b
Ausente	205,94 a

Médias de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Não houve um incremento no peso total de grãos/planta em plantas tratadas com silício aplicado no solo e via foliar. Ainda nesse sentido, estes tratamentos apresentaram médias menores comparadas ao controle e ao tratamento misto (Tabela 16).

**Tabela 16.** Peso total de grãos/planta (g) em plantas de milho componentes do experimento de campo, para os tratamentos controle, silício aplicado no solo (SISO), silício aplicado via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Peso total de grãos/planta (g)
Controle	207,65 a
SISO	157,20 b
SIFO	159,33 b
Misto	188,27 a

Médias de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Diferentemente do observado em campo, no experimento conduzido em casa de vegetação houve uma interação significativa das variáveis insetos e tratamentos com silício via solo e/ou foliar (Tabela 17). De forma geral, foi observada uma redução no peso total de grãos/planta nas plantas tratadas com a aplicação de silício no solo, silício via foliar e silício no

solo e via foliar (misto) em plantas infectadas por fitoplasma. Nas plantas controle não foram observadas diferenças significativas para plantas infectadas e não infectadas.

Em relação ao tratamento com silício aplicado no solo e/ou via foliar não foi possível observar um incremento na produção resultante de sua aplicação em plantas infectadas. Em plantas submetidas à alimentação por cigarrinhas não infectantes e tratadas com silício no solo e via foliar (misto) foi observado um aumento no peso total de grãos/ plantas comparado às plantas controle.

**Tabela 17.** Peso total de grãos/planta em plantas de milho componentes do experimento em casa de vegetação e submetidas à alimentação de insetos infectantes, sadios e não submetidas à alimentação de insetos nos tratamentos controle, aplicação de silício no solo (SISO), aplicação de silício via foliar (SIFO) e aplicação de silício no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
<b>Controle</b>	98,70 a A	97,30 b A	109,40 a A
<b>SISO</b>	89,20 a B	127,90 ab A	113,40 a AB
<b>SIFO</b>	65,50 a B	116,40 ab A	115,50 a A
<b>Misto</b>	71,50 a B	136,50 a A	130,30 a A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A redução na produção de grãos/planta em plantas infectadas por fitoplasma foi relatado por Toffanelli & Bedendo (2002). No estudo, foi observada que a redução no peso total de grãos por planta é proporcional ao número de insetos infectantes utilizados no período de acesso à inoculação. Almeida (2020) observou um comportamento semelhante, onde o peso total de grãos por planta foi reduzido em plantas submetidas à alimentação por cigarrinhas infectantes.

É sabido que o inseto vetor ao se alimentar das plantas de milho inocula o fitoplasma nos vasos do floema (BEDENDO, 2018). De acordo com Musetti et al. (2013) diversos estudos demonstram que a colonização por fitoplasma induz modificações citológicas e fisiológicas que resultam no mal funcionamento do transporte de fotoassimilados.

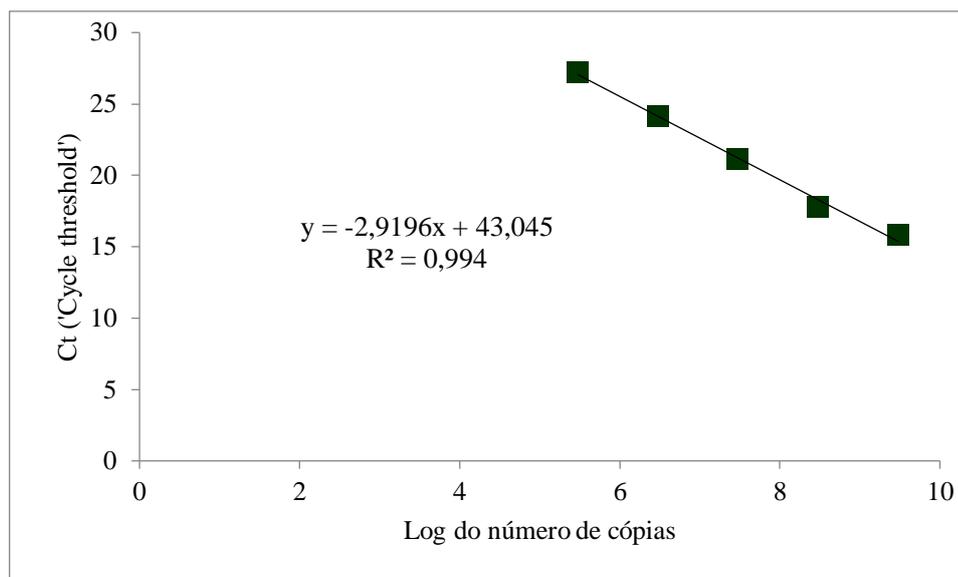
Os tratamentos com silício aplicado no solo e/ou via foliar foram utilizados com o objetivo de minimizar os danos causados pelo patógeno. Stephano et al. (2020) ao utilizar silício na cultura do milho observou um efeito positivo na produtividade. A produção de grãos em plantas fertilizadas com silício apresentou incremento de 4,8% comparada às plantas controle que não receberam o nutriente. Resultados semelhantes foram obtidos por Lourenço et al. (2017), os quais mostraram que a produção de grãos aumentou significativamente no tratamento

com silício comparado ao controle. Ainda, observado um incremento com o aumento da dose de silício. Os autores justificaram o aumento na produção em plantas com o uso de silício, com base no aumento do teor de clorofila e número de cloroplastos, melhorando a eficiência fotossintética, reduzindo a taxa de transpiração e gerando arquitetura mais adequada de plantas. Rodrigues et al. (2019) ao utilizar diferentes doses de silício via recobrimento de sementes observou um incremento na produção de grãos. Esta variável respondeu de forma quadrática às doses de silício e um ponto máximo de produção foi obtido com 17,53 g de silício/Kg de sementes.

O uso de silício na agricultura promove diversos benefícios às plantas, tais como incrementos no crescimento e produtividade, melhoria das propriedades mecânicas, aumento da capacidade fotossintética, resistência ao estresse hídrico, resistência à salinidade e aos efeitos tóxicos de metais, efeitos sobre as atividades enzimáticas, além de resistência contra patógenos (BARROS et al., 2010; ZAMBOLIM et al., 2012; ZAMBOLIM & ZANÃO JÚNIOR, 2012). Embora os resultados obtidos nesse estudo não tenham demonstrado o efeito esperado quanto à eficiência do silício em melhorar a resistência de plantas ao enfezamento vermelho, o uso potencial do silício objetivando reduzir os danos causados pelo fitoplasma na cultura do milho pode vir a ser uma alternativa no manejo da doença. Novos estudos com diferentes fontes de silício, doses, forma e período de aplicação e genótipos de milho devem ser considerados pela pesquisa na exploração dos benefícios que este nutriente poderá trazer visando minimizar os danos provocados pela doença.

#### **4.4. Quantificação do patógeno em tecido vegetal**

A equação  $[\text{Log do número de cópias de fitoplasma}/100 \text{ ng de DNA} = ((43,045 - \text{Ct})/2,9196)]$  foi utilizada para relacionar os valores de Ct ('Cycle Threshold') com a concentração de fitoplasmas nas amostras. Os cinco pontos da curva padrão de quantificação do patógeno dado em valores de Ct, foram 15, 18, 21, 24 e 27, respectivamente para as concentrações que variaram de 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng de DNA do patógeno por reação (Figura 6).



**Figura 6.** Curva padrão de correlação entre concentrações conhecidas de DNA (número de cópias de fitoplasma) e valores de Ct. (Y= Ct da amostra e X= log do número de cópias de fitoplasma/100ng de DNA)

A quantificação de células do fitoplasma foi realizada nas amostras provenientes de raiz, de folha do terço inferior e do terço superior de plantas de milho infectadas componentes do ensaio conduzido em casa de vegetação. A média do Ct das triplicatas foi utilizada na equação para a determinação do número de cópias de fitoplasma em 100 ng de DNA total. Não foi observada uma interação significativa entre as variáveis parte da planta amostrada e tratamentos com silício aplicado no solo e/ou via foliar (Tabela 18).

**Tabela 18.** Log do número de cópias de fitoplasma detectadas em 100 ng de DNA total de amostras de raiz (R), de folha do terço inferior (I) e do terço superior (S) de plantas componentes do experimento em casa de vegetação nos tratamentos controle, aplicação de silício no solo (SISO), uso de silício via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

Tratamento	Inseto		
	Raiz	Terço inferior	Terço superior
Controle	6,03	3,01	2,21
SISO	4,99	2,79	2,30
SIFO	6,24	3,03	2,81
Misto	5,59	2,77	2,37

A concentração de células do fitoplasma foi inferior no tratamento com silício aplicado no solo (3,36 log número de cópias de fitoplasma em 100 ng de DNA total) comparado às plantas tratadas com silício via foliar (4,03 log número de cópias de fitoplasma em 100 ng de DNA total). Em média, os tratamentos controle e misto apresentaram 3,75 e 3,58 log número de cópias de fitoplasma em 100 ng de DNA total, respectivamente. Apesar disso, os tratamentos

com silício aplicado no solo e/ou via foliar não apresentaram diferença significativa comparada as plantas controle (Tabela 19).

**Tabela 19.** Log do número de cópias de fitoplasma detectadas em 100 ng de DNA total de plantas componentes do experimento em casa de vegetação nos tratamentos controle, uso de silício no solo (SISO), aplicação de silício via foliar (SIFO) e silício aplicado no solo e via foliar (MISTO).

<b>Tratamento</b>	<b>Log do número de cópias de fitoplasma</b>
<b>Controle</b>	3,75 ab
<b>SISO</b>	3,36 a
<b>SIFO</b>	4,03 b
<b>Misto</b>	3,58 ab

Médias de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

De acordo com Bedendo (2018) a concentração do fitoplasma é variável de acordo com o órgão vegetal e o estágio de desenvolvimento da planta. Nesse estudo foi observado que a detecção do patógeno foi obtida em todas as amostras de raiz de plantas infectadas. Contudo, os resultados das análises de amostras de folha colhidas do terço inferior e superior plantas mostraram uma distribuição irregular do patógeno. Os resultados obtidos inicialmente nas análises realizadas com PCR normal foram confirmados pela quantificação do patógeno por meio de qPCR. A concentração do fitoplasma apresentou diferença significativa de acordo com a parte da planta onde foi realizada a coleta. O maior número de células de fitoplasmas foi encontrado em amostras de raiz (5,72 log número de cópias de fitoplasma em 100 ng de DNA total), seguido de folha do terço inferior (2,90 log número de cópias de fitoplasma em 100 ng de DNA total) e do terço superior (2,42 log número de cópias de fitoplasma em 100 ng de DNA total), respectivamente (Figura 25).

**Tabela 20.** Log do número de cópias de fitoplasma detectadas em 100 ng de DNA total de amostras de raiz, de folha do terço inferior e do terço superior de plantas componentes do experimento em casa de vegetação.

<b>Amostras</b>	<b>Log do número de cópias de fitoplasma</b>
<b>Raiz</b>	5,72 a
<b>Folha do terço inferior</b>	2,90 b
<b>Folha do terço superior</b>	2,42 c

Médias de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Marcone (2010), também menciona que os fitoplasmas colonizam as plantas de forma variável e seu movimento, distribuição e multiplicação apresentam relações com a sintomatologia. Segundo Saracco et al., (2005), a concentração do patógeno em uma planta

pode variar em função da suscetibilidade do hospedeiro, da sintomatologia, do genótipo do patógeno, da idade da planta no momento de infecção e das condições climáticas. Em seu estudo, Kuske & Kirkpatrick (1992) observaram que plantas de *Catharanthus roseus* infectadas pelo ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ apresentaram maior concentração do patógeno nas regiões meristemáticas e menores concentrações na raiz; ainda, a distribuição e concentração do patógeno nas plantas foram correlacionadas à expressão dos sintomas na parte aérea. No entanto, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram relatados por Wei et al. (2004) obtidos em ensaios conduzidos com plantas de crisântemo inoculadas experimentalmente com fitoplasma; neste caso, foi observado maior concentração do patógeno na raiz do que nas folhas. Trabalhos de Saracco et al. (2005) também são concordantes, pois estes autores mostraram que plantas de crisântemo infectadas por fitoplasma apresentaram significativamente maior concentração do patógeno no sistema radicular do que nas folhas apicais. Estudos da distribuição e concentração do fitoplasma nas diferentes partes de plantas de milho podem auxiliar no estabelecimento de um padrão para a amostragem de plantas, visando à detecção do fitoplasma para fins de confirmar a diagnose baseada nos sintomas visuais externos.

## **5. CONCLUSÕES**

O uso do silício aplicado no solo e/ou via foliar, nas doses usadas nos ensaios, não promoveu efeito positivo em plantas inoculadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho.

Os resultados mostraram que o fitoplasma apresentou distribuição e concentração variáveis nas diferentes partes amostradas das plantas, com maiores concentrações do patógeno encontradas no sistema radicular, seguido de folhas do terço inferior e do terço superior das plantas infectadas.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. A. **Efeito do Acibenzolar-S-metílico e filtrado da suspensão de células de *Streptomyces scabies* na indução de resistência de plantas de milho ao enfezamento vermelho causado por fitoplasma.** 220. 104 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Apostila. **Aplicações da PCR quantitativa em tempo real.** São Paulo, p. 51, 2009.
- BARIC S.; BERGER, J.; CAINELLI, C.; KERSCHBAMER, C.; LETSCHKA, T.; DALLAVIA, J. Seasonal colonization of apple trees by ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 129, p. 455-467, 2011.
- BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas à fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia. v. 26, p. 231-239, 2010.
- BEDENDO, I. P. Fitoplasmas e espiroplasmas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos.** São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. p. 181-190.
- BEDENDO, I. P.; LOPES, J. R. S. Impact and management of major phytoplasma diseases in Brazil. In: OLIVIER, C. Y.; DUMONCEAUX, T. J.; PÉREZ-LÓPEZ, E. (Ed.). **Sustainable Management of Phytoplasma Diseases in Crops Grown in the Tropical Belt- Biology and Detection.** Springer, Switzerland, 2019. p. 251-268.
- BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. **O milho e o clima.** Porto Alegre: Emater/RS – Ascar, 2014. 84 p.
- BERTACCINI, A.; DUDUK, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, n. 3, p. 355-378, 2009.
- COELHO, M. A. **Nutrição e adubação do milho.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Sete Lagoas. Circular técnica 78, 2006.
- Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2021). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos.** Brasília, Ministério da Agricultura: 8.
- CONTINI, E. et al. **Milho:** caracterização e desafios tecnológicos. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195075/1/Milho-caracterizacao.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2021.

- DAVIS, R. E. Fitoplasmas: fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 3, p. 1-27, 1995.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry**, New York, v. 19, p. 11-15, 1987.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360 p.
- FIRRAO, G.; ANDERSEN, M.; BERTACCINI, A.; BOUDON, E.; BOVÉ, J. M.; DAIRE, S.; DAVIS, R. E.; FLETCHER, J.; GARNIER, M.; GIBB, K. S.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; HARRISON, N.; HIRUKI, C.; KIRPATRICK, B. C.; JONES, P.; KUSKE, C. R.; LEE, I. M.; LIEFTING, L.; MARCONE, C.; NAMBA, S.; SCHNEIDER, B. SEARS, B. B.; SEEMUELLER, E.; SMART, C. D.; STRETEN, C.; WANG, K. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1243-1255, 2004.
- GUNDERSEN, D. E., LEE, I. M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. **Phytopathology Mediterranea**, v. 35, p. 144-151, 1996.
- HREN, M.; BOBEN, J.; ROTTER, A.; KRALIJ, P.; GRUDEN, K.; RAVNIKAR, M. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. **Plant pathology**, v. 56, p. 785-796, 2007.
- KORNDÖRFER, A. P.; GRISOTO, E.; VENDRAMIM, J. D. Induction of insect plant resistance to the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* Stål (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane by silicon application. **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 3, p. 387-392, 2011.
- KUMARI, S.; NAGENDRAN, K.; RAI, A. B.; SINGH, B.; RAO, G. P.; BERTACCINI, A. Global status of phytoplasma diseases in vegetable crops. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-15, 2019.
- KUSKE, C.R.; KIRKPATRICK, B.C. Distribution and Multiplication of Wessarn Aster Yellows Mycoplasma-like Organisms in *Catharanthus-Roseus* as Determined by DNA Hybridization Analysis. **Phytopathology**, v. 82, p.457-462, 1992.
- LEE, I. M., GUNDERSEN-RINDAL, D. E., HAMMOND, W., DAVIS, R. E. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assay to detect mixed MLO infections in a single host plant. **Phytopathology** v. 84, p. 559-566, 1994.

- LEE, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E; BARTOSZYK, I.M. Revised classification scheme of phytoplasmas based analyses of 16S rDNA and ribosomal protein gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.48, p.1153-1169, 1998.
- LEE, I. M.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 221-225, 2000.
- LIANG, Y.; NIKOLIC M.; BÉLANGER R.; GONG H.; SONG A. Silicon and insect pest resistance. In: **Silicon in Agriculture**. Springer, Dordrecht, 2015.
- LOPES, J. R. S.; OLIVEIRA C. M. Vetores de vírus e mollicutes em milho. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (Ed.) **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 35-60.
- LOURENÇO, M. F. C.; ROSA, A. J.; SIQUEIRA, A. P. S.; ARAUJO, L. S.; ALMEIDA, A. C.S.; JESUS, F. G.; CUNHA, P. C. R. Induction of resistance to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (Lepidoptera: Noctuidae) in transgenic and conventional corn plants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 9, p. 1176-1180, 2017.
- MADDEN, L. V.; NAULT, L. R. Differential pathogenicity of corn stunting mollicutes to leafhopper vectors in *Dalbulus* and *Baldulus* species. **Phytopathology**, v. 73, n. 12, p. 1608-1614, 1983.
- MAEJIMA, K; OSHIMA, K; NAMBA, S. Exploring the phytoplasmas, plant pathogens bacteria. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, p. 210-221, 2014.
- MARCONE, C. Movement of Phytoplasmas and the Development of Disease in the Plant. In: WEINTRAUB, P. G.; JONES, P. (Ed.). **Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors**. CAB International, 2010. p. 114-131.
- MARQUES, D. J.; BIANCHINI, H. C.; MACIEL, G. M.; MENDONÇA, T. F. N.; SILVA, M. F. Morphophysiological Changes Resulting from the Application of Silicon in Corn Plants Under Water Stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, 2021.
- MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I. P.; AMORIM, L.; LOPES, J. R. S. Quantificação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 136-142, 1999.
- MASSOLA JÚNIOR, N. S.; Enfezamentos vermelho e pálido: doenças em milho causadas por mollicutes. **Semina Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 237-243, 2001.
- MONTANO, H. G.; BRIOSO, P. S. T.; PIMENTEL, J. P. List of phytoplasma hosts in Brazil. **Bulletin of Insectology**, v. 60, n. 2, p. 129-130, 2007.

- MÔRO, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. Importância e uso do milho no Brasil. In: GALVÃO, J. C. C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M. A. G. (Ed.). **Milho: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2015. p. 09-25.
- MUSETTI, R.; BUXA, S. V.; DE MARCO, F.; LOSCHI, A.; POLIZZOTTO, R.; KOGEL, K. H.; VAN BEL, A. J. E. Phytoplasma-triggered Ca<sup>2+</sup> influx is involved in sieve-tube blockage. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 4, p. 379-386, 2013.
- NAIDOO, P. V.; MCFARLANE, S.; KEEPING, M. G.; CALDWELL, P. M. Deposition of silicon in leaves of sugarcane (*Saccharum spp. hybridus*) and its effect on the severity of brown rust caused by *Puccinia melanocephala*. **Proceedings of South Africa Sugar Technology**, v. 82, p. 542-546, 2009.
- NAULT, L. R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. **Phytopathology**, v. 70, p. 659-662, 1980.
- OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; QUERINO, R. B. Técnicas de criação da cigarrinha-do-milho para estudos de transmissão e de controle biológico. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (Ed.) **Doenças em milho: insetos-vetores, mollicutes e vírus**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2017. p. 155-180.
- OLIVEIRA, E.; PAIVA, F. A. Diagnose e manejo dos enfezamentos causados por mollicutes. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (Ed.) **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 133-146.
- POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; BOTELHO, D. M. S. Silicon in plant disease control. **Revista Ceres**, v. 62, n. 3, p. 323-331, 2015.
- RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; GOMES, R. J.; NASCIMENTO, K. J. T. Microscopic and biochemical aspects of sorghum resistance to anthracnose mediated by silicon. **Annals of Applied Biology**, v. 163, p. 114-123, 2013.
- RODRIGUES, L. A.; OLIVEIRA, I. C.; NOGUEIRA, G. A.; SILVA, T. R. B.; CANDIDO, A. C. S.; ALVES, C. Z. Coating seeds with silicon enhances the corn yield of the second crop. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, n. 4, p. 897-903, 2019.
- SABATO, E. O. Enfezamentos e Viroses no Milho. In: PAES, M. C. D. (Ed.) **Construindo sistemas de produção sustentáveis e rentáveis: palestras do XIV Seminário Nacional de Milho Safrinha**, Cuiabá, MT. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2017. p. 196-219.
- SABATO, E. O.; OLIVEIRA, M. **Doenças em milho: insetos-vetores, mollicutes e vírus**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2017. 278 p.

- SANDIM, A. S.; RIBON, A. A.; DIOGO, L. O.; SAVI, M. A. Doses de silício na produtividade do milho (*Zea mays* L.) híbrido simples na região de Campo Grande – MS. **Cultivando o saber**, Cascavel, v.3, n.1, p.171-178, 2010.
- SARACCO, P.; BOSCO, D.; VERATTI, F.; MARZACHI, C. Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant *Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insect vector. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67, p. 212-219, 2005.
- SILVA, E. S.; PRADO, R. M.; SOARES, A. A. V. L.; ALMEIDA, H. J.; SANTOS, D. M. M. Response of Corn Seedlings (*Zea mays* L.) to Different Concentrations of Nitrogen in Absence and Presence of Silicon. **Silicon**, v. 13, p. 813-818, 2020.
- SOUSA, J. V.; RODRIGUES, C. R.; LUZ, J. M. Q.; SOUSA, V. B. F.; CARVALHO, P. C.; RODRIGUES, T. M.; BRITO, C. H. Silicato de potássio via foliar no milho: fotossíntese, crescimento e produtividade. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 4, p. 502-513, 2010.
- STEPHANO, M. F.; GENG, Y.; CAO, G.; WANG, L.; MENG, W.; MEILING, Z. Effect of Silicon Fertilizer and Straw Return on the Maize Yield and Phosphorus Efficiency in Northeast China. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 52, n. 2, p. 116-127, 2020.
- TEODORO, P. E.; RIBEIRO, L. P.; CORRÊA, C. C. G.; TORRES, F. E. Desempenho de híbridos de milho sob aplicação foliar de silício no cerrado sul-mato-grossense. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 224-231, 2014.
- 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.
- TOFFANELLI, C. M.; BEDENDO, I. P. Efeito da população infectiva de *Dalbulus maidis* na produção de grãos e no desenvolvimento de sintomas do enfezamento vermelho do milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 82-86, 2002.
- USDA. United States Department of Agriculture. **World agricultural production**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- WEI, W.; KAKIZAWA, S.; SUZUKI, S.; JUNG, H.-Y.; NISHIGAWA, H.; MIYATA, S.; OSHIMA, K.; UGAKI, M.; HIBI, T.; NAMBA, S. In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. **Phytopathology**, v. 94, p. 244-250, 2004.

ZAMBOLIM, L.; ZANÃO JÚNIOR, L. A. Elementos benéficos envolvidos na indução da resistência de plantas a doenças. In: ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; ZANÃO JÚNIOR, L. A. **Efeito da nutrição mineral no controle de doenças de plantas**. Minas Gerais: UFV, 2012. p. 237-251.

ZAMBOLIM, L.; ZANÃO JÚNIOR, L. A.; VENTURA, J. A. Mecanismos de ação de silício na redução de doenças de plantas. In: \_\_\_\_\_. **Efeito da nutrição mineral no controle de doenças de plantas**. Minas Gerais: UFV, 2012. p. 253-285.

ZANÃO JÚNIOR, L. A.; RODRIGUES, F. A., FONTES, R. L. F.; KORNDÖRFER, G. H.; NEVES, J. C. L. Rice resistance to brown spot mediated by silicon and its interaction with manganese. **Journal of Phytopathology**, v. 157, p. 73-78, 2009.