

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

**Análise da aplicação experimental de silício em plantas de milho  
visando a resistência ao enfezamento vermelho causado por fitoplasma**

**Ariela Alexandre Inocêncio Rizo**

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

**Piracicaba  
2024**

**Ariela Alexandre Inocência Rizo**  
**Engenheira Agrônoma**

**Análise da aplicação experimental de silício em plantas de milho visando a resistência ao  
enfezamento vermelho causado por fitoplasma**  
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba**  
**2024**

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

Rizo, Ariela Alexandre Inocência

Análise da aplicação experimental de silício em plantas de milho visando a resistência ao enfezamento vermelho causado por fitoplasma / Ariela Alexandre Inocência Rizo. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

45 p.

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

1. *Zea mays* 2. *Daubulus maidis* 3. Controle alternativo 4. Maize bushy stunt  
I. Título

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer à Deus, que sem ele eu não estaria aqui, pois ele é a fonte da minha vida, da minha fé e meu colo em momentos difíceis.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao departamento de Fitopatologia e Nematologia pela oportunidade de fazer parte de um programa de pós-graduação tão renomado. A todos os professores, funcionários e colegas de laboratório que compartilharam seus conhecimentos. A CAPES pelo financiamento da minha bolsa de estudos.

Aos meus pais, Lélia e Helenor que sempre foram minha base, me apoiando em todas as minhas escolhas, me dando força e motivos para seguir os meus sonhos. Sem vocês nada disso seria possível.

À minha vizinha Hilda (*in memoriam*) que eu amo tanto, que partiu enquanto eu fazia o mestrado, obrigada por ter sido incrível vó, exemplo de mulher guerreira e batalhadora. Guardarei a sua risada gostosa em meu coração enquanto eu viver.

Ao meu marido Yorran, por ter deixado tudo tão leve e doce na minha trajetória do mestrado, sendo sempre meu apoio, que mesmo distante fisicamente sempre se fez presente em todos os meus dias.

À minha companheira e minha caçulinha Gabi, por dividir todos os dias de mestrado comigo, por aguentar os trancos e barrancos, deixando cada dia que passei em Piracicaba doce, descontraído e alegre. Minha companheira dos vinhos e conversas na varanda, obrigada por tudo. Não imaginaria o mestrado sem você.

Aos meus amigos que vou levar por toda minha vida, que me fazem sentir tanta saudade de Piracicaba, Julia, Egon, Junior, Aline, Bruno, Miqueias, João... Que honra ter conhecido cada um de vocês e que sorte poder ter dividido um pedaço da minha vida com vocês. Vocês foram essenciais nesta minha jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo, por tamanhos ensinamentos, por toda paciência e por ter sido um ótimo mentor.

À minha amiga Mabi, por todo companheirismo e amizade, por vibrar comigo todas as minhas conquistas e por acreditar em casa sonho louco meu. Você é incrível amiga.

As minhas amigas, Monica e Dani por tantos anos de companheirismo e amizade.

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

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

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO .....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	9
2.1 Cultura do milho .....	9
2.2 Fitoplasmas .....	10
2.3 Enfezamento vermelho do milho .....	12
2.4 Cigarrinha do milho .....	13
2.5 Uso de silício no manejo de doenças .....	14
3. METODOLOGIA .....	17
3.1 Obtenção de populações infectantes de cigarrinhas.....	17
3.2 Uso de silício em plantas de milho em casa de vegetação.....	17
3.3 Aplicação de fonte de silício e inoculação experimental.....	18
3.4 Avaliação do ensaio .....	19
3.5 Detecção de fitoplasma: extração .....	19
3.6 Detecção do fitoplasma: condições de PCR .....	20
3.7 Análise estatística.....	20
4. RESULTADO E DISCUSSÃO .....	23
4.1 Detecção do fitoplasma.....	23
4.2 Sintomatologia .....	23
4.3 Componentes de produção .....	25
4.3.1 Altura de plantas .....	25
4.3.2 Diâmetro de colmo.....	26
4.3.3 Número de espigas por planta.....	27
4.3.4 Comprimento e diâmetro de espiga .....	28
4.3.5 Número de fileiras de grãos por espiga e peso total de grãos.....	30
5. CONCLUSÕES .....	35
REFERÊNCIAS.....	37

## RESUMO

### **Análise da aplicação experimental de silício em plantas de milho visando a resistência ao enfezamento vermelho causado por fitoplasma**

No Brasil, o milho é cultivado em todo o território, porém em épocas distintas de plantio, devido às variações de clima em cada região. Embora a produtividade seja alta, diversos fatores podem influenciar a rentabilidade da cultura, dentre eles a ocorrência de pragas e doenças. Dentre as doenças do milho o enfezamento vermelho, causado por fitoplasma, tem sido relatada como uma das mais importantes, principalmente no sistema de plantio conhecido como “milho safrinha”. Como componentes do manejo, visando a minimização de danos, tem sido recomendados o uso de genótipos parcialmente resistentes, a aplicação de produtos químicos para controle do inseto vetor e evitar o plantio em épocas favoráveis ao aumento da população do vetor. Dentre as medidas de controle alternativo, a aplicação de silício desponta como potencial elemento, com base em seus resultados positivos relatados em outros patossistemas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a sua influência sobre desenvolvimento do enfezamento vermelho em dois híbridos de milho. As aplicações foram realizadas via solo, em duas dosagens diferentes em plantas experimentalmente inoculadas com cigarrinhas portadoras do fitoplasma. As avaliações foram baseadas na detecção de plantas infectadas e nos componentes de produção tais como, altura de planta; diâmetro de colmo; número de espigas por planta; comprimento, diâmetro e número de fileiras de grãos por espigas; e peso total de grãos por planta. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que independente da dosagem e do híbrido utilizado, o silício não influenciou na redução dos danos e sintomas nas plantas inoculadas com fitoplasma. Como resultado interessante do ensaio, foi observado que o fitoplasma foi detectado com maior frequência em material coletado de raízes do que aquele amostrado na parte aérea das plantas.

Palavras-chave: *Zea mays*, *Daubulus maidis*, Controle alternativo, Maize bushy stunt

## ABSTRACT

### **Experimental analysis of silicon application on maize plants aiming resistance to the maize bushy stunt disease caused by phytoplasma**

In Brazil, corn is cultivated throughout the territory, but in distinct seasons, according to the climate present in each region. Although the culture has high yield, several factors can influence the profitability of the crop, among them the occurrence of pests and diseases. Among the corn diseases maize bushy stunt or red stunt, caused by a phytoplasma has been described as very important, mainly for the system of planting denominated “safrinha”. The management of these diseases is currently carried out by planting genotype partially resistant, use of chemical products for control of vector and avoiding planting in times favorable to the insect population. Among the control alternatives, silicon appears as potential measure, based on positive results reported for another pathosystems. Thus, the present study aimed to evaluate its influence on the development of red stunt in two maize hybrids. Silicon was then applied via soil, with two dosages in plants inoculated with leafhoppers carrying the phytoplasma. The evaluation was based on the detection of infected plants and production components such as plant height; stem diameter; number of ears by plant; length, diameter and number of grains per ear and total grain weight by plant. The results obtained in the present study demonstrated that, regardless of the dosage and hybrid used, silicon did not influence the reduction of damage and symptoms in plants inoculated with phytoplasma. Interestingly, it was observed that the phytoplasma was detected more frequently in material sampled from roots than those collected from aerial part of plants.

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

## 1. INTRODUÇÃO

O milho é reconhecidamente um componente importante na alimentação humana e animal, o que torna esta cultura economicamente relevante. A produção mundial de milho estimada para o biênio 2021/2022 deverá ultrapassar 1,2 bilhões de toneladas (USDA, 2022; CONAB, 2023).

No Brasil o milho é cultivado em todas as regiões, porém as épocas de plantio variam de acordo com a localização e as condições climáticas de cada região geográfica. A primeira safra, tradicionalmente realizada na época primavera/verão, predominava nas maiores regiões produtoras. A segunda safra, conhecida como “safrinha”, passou a ser implantada a partir da década de 1980, com a semeadura realizada na época verão/outono. Com o desenvolvimento da cultura da soja, o plantio de primeira safra passou a ter uma redução gradativa ao longo do tempo. Atualmente, a “safrinha” é responsável por cerca de 77% da produção de milho no Brasil (Contini et al., 2019; CONAB, 2023).

Embora altas produtividades tenham sido obtidas, existem vários fatores que podem influenciar na rentabilidade da cultura, entre eles, genótipos, condições climáticas, tratos culturais e ocorrências de pragas e doenças. Dentre as doenças, os enfezamentos vermelho e pálido causados, respectivamente, por fitoplasma e espiroplasma, vem exigindo atenção especial dos produtores, especialmente para os cultivos de “safrinha”, implantados em época altamente favorável ao desenvolvimento da população do vetor de ambos os patógenos (Sabato & Oliveira, 2017).

Os fitoplasmas são bactérias fitopatogênicas, com ausência de parede celular, parasitas obrigatórios, encontrados na hemolinfa de inseto vetores e no floema das plantas infectadas, sendo a cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*) o vetor responsável pela disseminação e transmissão do fitoplasma do milho em condições naturais (Sabato et al., 2017). O quadro sintomatológico exibido pelas plantas doentes se caracteriza inicialmente por manchas cloróticas nos bordos e ápice das folhas, que evoluem para o avermelhamento; redução do crescimento da planta; encurtamento de entrenós; proliferação de pequenas espigas; má formação de grãos; afinamento do colmo; florescimento precoce; redução do sistema radicular e perfilhamento basal e axilar (Bedendo, 2018).

A ocorrência da doença, tanto nos plantios tradicionais, como “safrinha”, promove reduções drásticas na produção, as quais chegam a se constituir em fator limitante para a cultura. Por exemplo, em condições experimentais foi observada a diminuição da produção de grãos em 91,3% quando as plantas foram submetidas a insetos vetores portadores do patógeno



(Toffanelli, 2001). No campo, sob infecção natural, foi constatada redução de, aproximadamente, 30% da produção em parcelas onde o vetor não foi controlado (Massola Junior, 2001). Constantemente, surtos da doença têm sido registrados em todo o país, como na safra 2015/16, com altas incidências da doença relatadas nas regiões produtoras de Goiás, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul e São Paulo (Sabato, 2017).

O manejo desta doença consiste praticamente na utilização de genótipos resistentes do hospedeiro e controle químico do inseto vetor. Embora as condições favoráveis à doença ocorram no sistema de “safrinha”, a redução do plantio tardio se torna inviável, devido ao interesse dos agricultores pela cultura da soja e da importância atual do milho implantado após a colheita desta oleaginosa. Uma medida alternativa que vem demonstrando resultados promissores para outros patossistemas envolvendo monocotiledôneas como arroz, cana de açúcar e sorgo é a utilização de silício (Si) no controle de doenças (Resende et al., 2013; Zanão Junior et al., 2009a; Naidoo et al., 2009). O silício não é considerado um nutriente essencial à planta, mas sua ação está relacionada com mecanismos de defesa de natureza estrutural e bioquímica, promovendo a resistência de plantas a alguns patógenos (Liang et al., 2015).

Um experimento anterior foi conduzido por Martins (2021), no qual foram utilizadas aplicações de silício via foliar e no solo, em condições de casa de vegetação e campo. Os resultados mostraram que plantas de milho tratadas com este mineral não apresentaram significância estatística em relação às plantas não tratadas, quanto ao aumento da resistência ao fitoplasma do enfezamento.

Levando-se em consideração a importância do enfezamento vermelho na cultura do milho e os resultados promissores da utilização de silício como promotor de resistência em outros patossistemas, levanta-se a hipótese de que seu efeito no referido patossistema possa contribuir para minimizar os danos causados pela doença. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a influência do silício em duas dosagens via solo, na resistência a danos causados pelo fitoplasma do enfezamento vermelho do milho em dois híbridos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie que pertence à família Poaceae. Acredita-se que a sua região de origem seja o México, tendo sido desenvolvido há, aproximadamente, dez mil anos. Com o tempo, devido à seleção natural e à domesticação, o milho se tornou uma planta anual, robusta e ereta, que varia em altura de um a quatro metros. É considerada uma das mais eficientes plantas armazenadoras de energia existente na natureza, devido ao seu elevado potencial de acumulação de fotoassimilados (Contini et al., 2019; Môro & Fritsche-Neto, 2015).

A planta possui mecanismos que mantém alta relação CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, com metabolismo fotossintético do tipo C<sub>4</sub>. As respostas do milho às variáveis climáticas estão relacionadas ao seu metabolismo C<sub>4</sub> que resulta em alta produtividade, e, conseqüentemente, proporciona alto rendimento de grãos (Bergamaschi & Matzenauer, 2014). No Brasil, um país de clima tropical, o cultivo do milho possui grande vantagem quando comparado a países que apresentam diversidade climática. As condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento das plantas ocorrem na faixa de 25°C, juntamente com umidade e luminosidade adequadas. As exigências podem variar de acordo com o estágio fenológico em que a planta se encontra, podendo ser mais exigente em alguns fatores comparados a outros (Fancelli & Dourado Neto, 2004).

A produção pode ser destinada à alimentação humana e/ou animal, devido as suas elevadas qualidades nutricionais, como também ser empregada na indústria para a geração de uma ampla variedade de produtos, com destaque para a produção de biocombustíveis. O milho é uma das principais ‘commodities’ agrícolas, sendo responsável por 39% da produção mundial de cereais (FAO, 2020). O Brasil se estabeleceu como o terceiro maior produtor e segundo maior exportador de milho do mundo, com base na safra 2020/21. Estimativas indicam que a safra 2022/2023 pode atingir uma produção total de 310,9 milhões de toneladas de grãos. Apesar do mercado brasileiro de milho ter apresentado altas produtividades, o setor ainda precisa solucionar alguns obstáculos que podem ter um papel importante no rendimento da cultura, como, cultivares/híbridos, clima, solo, práticas culturais e manejo de pragas e doenças (Barros et al., 2010; CONAB, 2023).

No Brasil, podemos encontrar o milho em duas safras ao ano, gerando assim um sistema de produção intensivo. A segunda safra, mais conhecida como “safrinha”, atualmente possui elevada importância, observando que inicialmente era implantada como uma renda alternativa e, atualmente, passando a se tornar fonte de renda aos produtores. De acordo com o CONAB (2020), na safra 2019/2020, 73% da produção de milho foi proveniente da segunda

safra, atualmente o milho de segunda safra ultrapassa 79% da área plantada, o volume estimado representa a maior produção registrada na história (CONAB, 2022). Comumente se implanta a segunda safra logo em seguida ao cultivo de soja, o que ocorre no final do verão e a colheita no inverno. Alguns estados brasileiros, como Alagoas, Bahia e Sergipe tem implementado a safra adicional do milho, ou seja, a terceira safra, por meio do plantio irrigado (CONAB, 2020).

O desenvolvimento de novos sistemas é benéfico levando em consideração o acréscimo no índice de produção, no entanto, por consequência, o sistema favorece a ocorrência de pragas e doenças fazendo com que o manejo seja dificultado. Devido aos sucessivos plantios de duas a três safras por ano, os patógenos encontram constantemente o milho no campo, servindo, na maioria das vezes, como fonte de inoculo de patógenos (Meneses et al., 2016). Doenças que anteriormente eram consideradas secundárias passaram a ter maior importância, visto que os prejuízos causados na cultura do milho vêm crescendo consideravelmente. O aumento da população de insetos vetores têm sido favorecido por condições climáticas ocorrentes nos plantios tardios, causando preocupações para os produtores, principalmente em se tratando da cigarrinha do milho (*Daubulus maidis*) (Bedendo & Lopes, 2019). Consequentemente, as doenças transmitidas por estas cigarrinhas tiveram sua incidência aumentada, podendo-se citar a risca causada pelo Maize Rayado Fino Virus, o enfezamento vermelho pelo Maize Bushy Stunt Phytoplasma e o enfezamento pálido pelo *Spiroplasma kunkelii* (Nault, 1980).

## 2.2 Fitoplasmas

Os fitoplasmas pertencem ao Domínio Bacteria, Classe *Mollicutes*, Ordem *Acholeplasmatales*, Família *Acholeplasmataceae* e Gênero “*Candidatus Phytoplasma*”. São bactérias gram-positivas, sem parede celular, habitantes de floema e transmitidas por insetos (Bedendo 2018). Inicialmente foram denominados de organismos do tipo micoplasmas (Lee et al., 1998). Não apresentam forma definida, sendo suas células pleomórficas, porém são normalmente visualizadas como corpúsculos arredondados no interior das células hospedeiras (Marcone, 2014).

As dimensões variam de 1µm a 2µm, possuem genoma pequeno variando de 530Kb-2220Kb, são considerados minúsculas se comparadas a outras fitobactérias (Gasparich, 2010). Mesmo com um genoma reduzido possuem genes que codificam funções celulares de replicação de DNA, transcrição, tradução e translocação de proteínas, porém na sua evolução reductiva perderam genes de vias de biossíntese de aminoácidos e ácidos graxos, síntese de ATP,

ácido tricarbóxico e transporte de elétrons/fosforilação oxidativa (Oshima et al., 2004; Bai et al., 2006; Oshima et al., 2007; Kube et al., 2012; Oshima et al., 2013; Saigo et al., 2014; Namba, 2019; Huang et al., 2020)

Os fitoplasmas são microrganismos extremamente fastidiosos e dificilmente cultivados em meio de cultura. A identificação e caracterização de fitoplasmas não são possíveis pelos métodos tradicionais aplicados às bactérias cultiváveis. Em razão desta limitação os fitoplasmas são nomeados de “*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*” (IRPCM, 2004). A detecção do patógeno em planta suspeita de infecção pode ser feita de forma direta em microscópio eletrônico de transmissão, com a observação de corpúsculos pleomórficos presentes no interior dos vasos do floema, ou de forma indireta, por meio da técnica molecular de PCR (Lee et al., 2000; Bedendo, 2018).

Os fitoplasmas estão distribuídos mundialmente e se encontram associados a centenas de doenças ocorrentes em ampla diversidade de espécies botânicas, dentre elas culturas de importância econômica como cereais, hortaliças e fruteiras, além de espécies florestais e ornamentais (Maejima et al., 2014; Bertaccini & Duduk, 2009). Plantas infectadas com fitoplasmas apresentam sintomas característicos de distúrbios hormonais, entre eles superbrotamento de ramos, clorose generalizada, enfezamento ou nanismo, encurtamento de entre-nós, malformações de folhas e flores, perfilhamento basal ou axilar, avermelhamento foliar, necrose de floema, virescência e filodia (Bedendo, 2018).

A infecção por esses microrganismos afeta a homeostase de nutrientes e provoca mudanças bioquímicas na planta (Junqueira et al., 2011). Há regulação da expressão de genes associados a síntese de fito-hormônios, que atuam como componentes do sistema de defesa da planta contra insetos ou microrganismos nocivos à planta (Yan & Xie 2015; Paolacci et al., 2017). Para suprimir as estratégias de controle, os fitoplasmas secretam efetores, alterando drasticamente as vias fisiológicas da planta e induzem alterações distintas (Miché et al., 2018; Toruño et al., 2016). As proteínas SAP11 desestabilizam o fator de transcrição conhecido como “Teosinte Branched D 1, Cycloidea, PCF1 (TCP)” e regulam uma série de processos moleculares e morfológicos da planta, sendo responsáveis por induzir brotações axilares e evitar o desenvolvimento da inflorescência em milho (Chang et al., 2018; Pecher et al., 2019). O efector Tengu inviabiliza as vias de sinalização de auxina e ácido jasmônico, o que conseqüentemente induz nanismo, proliferação de brotos no caule e esterilidade (Hoshi et al., 2009; Minato et al., 2014). Alguns efetores como, Sap54 e PhyL1, provocam filodia, convertendo flores em tecidos semelhantes a folhas (Maejima et al., 2014; Iwabuchi et al., 2019).

Para o fitoplasma do milho, os homólogos de Sap11 demonstraram ser responsáveis pela indução de brotos axilares e dificultar o desenvolvimento de inflorescências em plantas de milho (Pecher et al., 2019). Até então, os fitoplasmas do milho demonstraram que o polimorfismo de lipoproteína, possivelmente um efetor, e uma lipoproteína ATP dependente de proteína de exportação ABC, são responsáveis pelos sintomas de brotações laterais, plantas atrofiadas, proliferação de espigas, folhas deformadas e necrosadas, folhas amareladas e avermelhamento intenso (Orlovskis et al., 2017).

Geralmente os sintomas causados por fitoplasmas e espiroplasmas são semelhantes como, filodia, virescência, amarelecimento generalizado, encurtamento de entre-nós, vassoura de bruxa e necrose do floema (Gasparich, 2010). Alguns sintomas são, em tese, estratégias evolutivas de fitoplasmas para manipular os insetos vetores de modo a aumentar sua disseminação entre hospedeiros, como no caso de vassoura de bruxa e virescência (Hogenhout & Loria, 2008; Sugio et al., 2011; Sugio & Hogenhout, 2012; Orlovskis & Hogenhout, 2016; Tomkins et al., 2018).

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

A doença foi reportada pela primeira vez no território mexicano na década de 1950, de acordo com Gordon et al., 1981 e Bascopé & Galindo 1981. No Brasil, o enfezamento vermelho foi reportado pela primeira vez na década de 1970, sendo a doença considerada de importância secundária para a cultura, porém com o alerta de que poderia causar sérios danos à cultura instalada tardiamente (Costa et al., 1971). Esta previsão foi confirmada a partir da década de 1980 com a adoção generalizada do plantio do milho safrinha. Assim, a presença frequente do milho no campo, principalmente resultante do plantio de “safrinha”, a sobrevivência do patógeno e do inseto vetor favoreceram a disseminação da doença (Oliveira et al., 1998).

Diversos fatores podem influenciar a incidência e severidade da doença, destacando-se a suscetibilidade de genótipos utilizados, a população do inseto vetor, a abundância de fontes de inóculo (plantas voluntárias ou tiguerras) e os fatores climáticos do ambiente. Apesar da importância da doença ao longo dos anos, foi marcante a ocorrência de severos surtos nos plantios de “safrinha” de 2015, principalmente no sudoeste de Goiás, estado de São Paulo, oeste da Bahia e no sul de Minas Gerais. Esses surtos se prolongaram até as safras de 2016 e 2017, causando danos expressivos em áreas de produção (Sabato, 2017). A sobreposição de ciclos do milho durante todo o ano aumenta os níveis de incidência e severidade, garantindo a

perpetuação tanto do patógeno, quanto do inseto vetor. No entanto, as maiores intensidades da doença são encontradas em plantios tardios, implementados no período de dezembro a março (Maejima et al., 2014).

Os sintomas são expressos em maior intensidade no estágio reprodutivo, podendo se manifestar antes, ou na fase de florescimento. As plantas podem exibir nanismo, entrenó curto, afinamento de colmo, proliferação de espigas malformadas, folhas com manchas cloróticas, que evoluem para a coloração vermelha (Massola Junior et al., 1999; Oliveira, 2015).

Uma medida em potencial a ser adotada para a redução da gravidade da doença seria a eliminação ou diminuição de cultivos tardios. No entanto, a “safrinha” possui um papel muito importante na produção brasileira de grãos. Atualmente, as medidas mais recomendadas têm sido a utilização de genótipos parcialmente resistentes, juntamente com o controle químico do inseto vetor, utilizando-se inseticidas tanto no tratamento de sementes, quanto em pulverizações das plantas (Oliveira et al., 2015; Albuquerque et al., 2006).

## 2.4 Cigarrinha do milho

Os fitoplasmas são habitantes do floema e, por se alimentarem da seiva destes vasos condutores, as cigarrinhas são seus principais vetores (Weintraub & Beanland, 2006). As cigarrinhas da ordem Hemiptera pertencentes à família Cicadellidae são relatadas como vetoras destes fitopatógenos e, especificamente para o fitoplasma do milho, são citadas as espécies *Dalbulus elimatus*, *Dalbulus maidis*, *Baldulus tripsaci* e *Graminella nigrifrons* (Lopes & Oliveira, 2004). Características relacionadas às peças bucais permitem a aquisição do fitoplasma pela alimentação realizada em plantas infectadas e sua transmissão para plantas sadias; ainda, estas características não promovem danos às células da planta, fazendo com que seja evitada a produção de compostos de defesa (Weintraub & Beanland, 2006).

Cigarrinhas da espécie *D. maidis*, mais conhecida como a cigarrinha do milho, possuem maior eficiência de transmissão, variando de 43,9 a 88,9% (Lopes & Oliveira, 2004; Madden & Nault, 1983; Nault, 1980). Esta espécie é reconhecida como a mais importante no Brasil e nos principais países da América, por ser o único vetor que transmite simultaneamente o fitoplasma, o espiroplasma, o vírus da risca e o vírus do mosaico estriado (Sabato, 2017; Vilanova et al., 2022). Em termos morfológicos, a cigarrinha do milho possui comprimento variável de 3,7 a 4,3mm, sendo que as fêmeas, na maioria das vezes, são maiores que os machos. A coloração dos adultos varia de acordo com o clima, mas ocorre o predomínio da coloração parda clara ao verde escuro (Triplehorn & Nault, 1985). O potencial de reprodução das

cigarrinhas é elevado, o ciclo biológico é completado em 25 dias, passando por cinco instares, onde cada instar possui duração média de três a quatro dias. Levando em consideração a duração da safra do milho, em condições favoráveis as cigarrinhas podem completar de quatro a cinco gerações. Devido a ampla faixa de temperatura (17° a 35°C) em que as cigarrinhas conseguem se desenvolver, a sua distribuição geográfica é bastante ampla (Waquil et al., 1999; Nieuwenhove et al., 2016), sendo encontradas em todas as regiões brasileiras (Oliveira et al., 2013b, 2017). No Brasil, o pico populacional da cigarrinha é atingido nos meses de março e abril, coincidindo com o período em que ocorre o cultivo do milho safrinha; assim, a disseminação é favorecida, aumentando a incidência e intensidade da doença no campo (Waquil et al., 1997; Oliveira et al., 1998). A espécie é uma praga exclusiva da cultura do milho, porém durante a entressafra, na ausência de seu hospedeiro principal, a cigarrinha consegue sobreviver em hospedeiros alternativos pertencentes à família Poaceae (Nault, 1980; Summers et al., 2004; Oliveira et al., 2020). Outra alternativa de sobrevivência para a cigarrinha é a dispersão para novas áreas cultivadas com milho (Moya-Raygoza et al., 2007; Oliveira et al., 2013a).

O vetor pode adquirir o fitoplasma tanto no estágio de ninfa como de adulto; entretanto, em razão do período de latência, o inseto somente estará apto a transmitir o patógeno quando atingir a fase adulta (Nault, 1980; Moya-Raygoza & Nault, 1998). Devido à relação persistente propagativa, a aquisição do patógeno pelo vetor torna-o transmissor durante todo o seu período de vida, porém não ocorre transmissão transovariana (Bedendo, 2018; Lopes & Oliveira, 2004).

A cigarrinha do milho apresenta características que dificultam seu controle, como por exemplo, o seu elevado potencial de reprodução, sua capacidade de migrar a longas distâncias e sua alta eficiência e rapidez na transmissão do patógeno. De maneira geral, a utilização de medidas preventivas no controle do vetor pode evitar a alta ocorrência da doença (Oliveira et al., 2013a). O tratamento com inseticida é um dos métodos mais amplamente utilizados para o controle. Atualmente existem 63 produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2022) para o controle da cigarrinha na cultura do milho na fase adulta, ninfa e ovo (Oliveira et al., 2007).

## **2.5 Uso de silício no manejo de doenças**

De maneira geral, quando a nutrição mineral está equilibrada, há tendência de uma redução na incidência e intensidade de doenças nas plantas. Dentre os nutrientes importantes para a defesa está o silício, que é considerado o segundo elemento mais abundante do solo,

compreendendo aproximadamente 28% da crosta terrestre. Apesar de não ser considerado um nutriente essencial, é relatado como um elemento benéfico às plantas, conferindo maior tolerância à seca, maior resistência à toxicidade por metais e melhoria nas defesas do hospedeiro contra pragas e doenças (Pozza et al., 2015). O acúmulo deste nutriente é considerado igual ou superior aos nutrientes essenciais em espécies pertencentes à família Poaceae (Rodrigues & Datnoff, 2015). Os efeitos benéficos do silício associados à resistência de plantas a doenças têm sido demonstrados tanto em espécies monocotiledôneas como dicotiledôneas (Pozza et al., 2015).

O mecanismo de ação deste elemento está relacionado às funções de regulação da evapotranspiração, sendo também capaz de criar uma barreira de resistência física dificultando a invasão e desenvolvimento do patógeno para o interior da planta, uma vez que o elemento é depositado formando uma camada de sílica nas paredes celulares e espaços intercelulares das células das folhas e raízes (Barros et al., 2010; Pozza et al., 2015). Alguns pesquisadores levantaram a hipótese de que o silício controla o desenvolvimento do patógeno não pela sua deposição nas células das folhas e raízes, mas sim porque tinha papel fisiológico que resultava na regulação positiva das defesas da planta, ou seja, um mecanismo de defesa química. Em pepino foi demonstrado que o silício aumentou as atividades das enzimas quitinase, peroxidases, polifenoloxidasas, lipoxigenase e compostos fenólicos (Cai et al., 2008; Shetty et al., 2011). Ainda, foi constatado que a produção de fitoalexinas específicas associadas à resistência era mediada por este elemento químico. Em trigo, níveis reduzidos de infecção foram correlacionados ao uso de silício, observando-se alteração na taxa de desenvolvimento e extensão da colonização fúngica. Em células epidérmicas de cereais eram reconhecidos dois mecanismos de defesa, ou seja, resistência à penetração com formação de papila e reação de hipersensibilidade; no entanto, ensaios com silício indicaram que existia uma terceira linha de defesa ativa, caracterizada pelo acúmulo acentuado de compostos fenólicos em células epidérmicas e na membrana extra-haustorial (Belanger et al., 2003). No arroz, por exemplo, o acúmulo de silício é de cerca de 108% maior do que o de nitrogênio (Rodrigues & Datnoff, 2015; Pozza et al., 2015). A aplicação de silício na cultura do arroz vem sendo largamente utilizada devido às respostas vantajosas no aumento da resistência a doenças como, por exemplo, brusone. Estudos conduzidos por Kozaka, (1965) também relataram redução no número de lesões de brusone nas folhas à medida em que o teor de silício no tecido foliar aumentou. Ainda em arroz, a aplicação de silício resultou na indução de resistência à mancha-parda (Datnoff et al., 1997; Zanão Junior et al., 2009a; 2009b; Prabhu et al., 2012).





### **3. METODOLOGIA**

A pesquisa foi realizada no período de junho a novembro de 2022. Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, localizada na área experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (USP), no município de Piracicaba, Estado de São Paulo, 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 de cigarrinhas**

As populações iniciais de cigarrinhas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, localizado no Departamento de Entomologia da ESALQ/USP. Posteriormente as multiplicações destas populações foram realizadas na área experimental do departamento de Fitopatologia e Nematologia. Uma população infectante e uma não infectante foram produzidas em gaiolas.

As colônias foram mantidas em casa de vegetação em gaiolas teladas com dimensões de 60x30x30 cm como descrito por Oliveira et al. (2004). Para a população infectante, as cigarrinhas foram confinadas em plantas fontes comprovadamente infectadas com o fitoplasma. O primeiro contato do inseto com o hospedeiro deu início ao período de acesso à aquisição (PAA), no qual o inseto se alimentou da seiva de uma planta infectada com o patógeno por um período de quatro dias. Na sequência, os insetos foram transferidos para plantas saudias, onde permaneceram por 21 dias, correspondentes ao período de latência (PL), este período se deve à relação patógeno-hospedeiro ser do tipo persistente propagativa. Após este período, as cigarrinhas infectantes foram consideradas aptas para a transmissão do fitoplasma para novas plantas de milho componentes do experimento.

#### **3.2 Uso de silício em plantas de milho em casa de vegetação**

A semeadura foi realizada em substrato contido em vasos de plástico PL30 com volume de 12 litros. As sementes dos híbridos utilizados foram DKB 290 PRO3 (maior suscetibilidade) e AG 8088 PRO2 (menor suscetibilidade) desenvolvidos pela Bayer®. A semeadura foi feita na profundidade de 3 a 5 cm, sendo que cada híbrido foi submetido aos diversos tratamentos experimentais. A adubação mineral de nitrogênio, fósforo e potássio

(NPK) foi baseada na análise de solo, de acordo com a recomendação para a cultura (Coelho 2006). Como fonte de silício foi utilizado o silicato de cálcio (Agrosilício®, Excell Minerais e Fertilizantes Ltda) (Ca 25%, Si10,5% e Mg 6%) incorporado ao substrato, em uma única aplicação. O produto foi aplicado em duas dosagens, sendo a dose 1 na base de 2,0 t/ha e dose 2 na base de 3,5 t/ha (Roma, 2010; Miranda et al., 2018)

Os tratamentos consistiram de: tratamento SI-RE 1 (Silício dose 1 + Cigarrinha infectante + Híbrido resistente), SNI-RE 1 (Silício dose 1 + Cigarrinha não infectante + Híbrido Resistente), SSC-RE 1 (Silício dose 1+ Não confinamento de cigarrinha), SI-SU 1 (Silício dose 1+ Cigarrinha infectante + Híbrido susceptível), SNI-SU 1 (Silício dose 1 + Cigarrinha não infectante + Híbrido susceptível), SSC-SU 1 (Silício dose 1+ não confinamento de cigarrinhas + Híbrido susceptível), SI-RE 2 (Silício dose 2 + Cigarrinha infectante + Híbrido resistente), SNI-RE 2 (Silício dose 2 + Cigarrinha não infectante + Híbrido Resistente), SSC-RE 2 (Silício dose 2 + Não confinamento de cigarrinha), SI-SU 2 (Silício dose 2 + Cigarrinha infectante + Híbrido susceptível), SNI-SU 2 (Silício dose 2 + Cigarrinha não infectante + Híbrido susceptível), SSC-SU 2 (Silício dose 2 + não confinamento de cigarrinhas + Híbrido susceptível), Controle I-RE (Ausência de Silício + Cigarrinhas infectantes + Híbrido resistente), Controle NI-RE (Ausência de silício + Cigarrinhas não infectantes + híbrido resistente), Controle SC-RE (Ausência de silício + não confinamento de cigarrinhas + Híbrido resistente), Controle I-SU (Ausência de Silício + Cigarrinhas infectantes + Híbrido susceptível), Controle NI-SU (Ausência de silício + Cigarrinhas não infectantes + híbrido susceptível), Controle SC-SU (ausência de silício + não confinamento de cigarrinhas + Híbrido susceptível). O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), sendo 12 tratamentos e os controles, cada um com seis repetições, onde cada planta representou uma repetição, totalizando 108 plantas.

A adubação de cobertura foi realizada em duas aplicações, sendo a primeira em plantas com seis a oito folhas e a segunda, em plantas com 15 a 20 dias após a primeira. As plantas foram conduzidas até o estágio produtivo para análise das variáveis de crescimento e componentes de produção.

### **3.3 Aplicação de fonte de silício e inoculação experimental**

A aplicação do produto fonte de silício foi realizada diretamente no solo antes da semeadura. A inoculação das plantas pelas cigarrinhas infectantes foi conduzida quando as plantas atingiram o estágio de três a quatro folhas completamente expandidas, correspondendo

a, aproximadamente, 10 dias após a semeadura. Foram confinadas dez cigarrinhas 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. Na sequência, as cigarrinhas foram coletadas e armazenadas a -80°C para detecção do fitoplasma. Posteriormente, foi realizada uma aplicação de inseticida para que não ocorresse eclosão de possíveis ovos que pudessem ter sido depositados nas plantas durante o período de acesso à inoculação.

### **3.4 Avaliação do ensaio**

Quando as espigas atingiram o estágio de grão pastoso, foram avaliados os parâmetros de altura de planta (cm), diâmetro de colmo (mm) e número de espigas por planta. Amostras de folhas do terço superior e inferior, além de material de raiz foram coletados visando a detecção do patógeno nos tecidos.

A colheita foi realizada quando os grãos atingiram umidade em torno de 14%. Os componentes de produção foram avaliados individualmente, como o peso total de grãos (g) por planta, comprimento de espigas (cm), diâmetro de espigas (mm) e número de fileiras de grãos por espigas.

### **3.5 Detecção de fitoplasma: extração**

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de Doyle & Doyle, (1987) onde foram utilizadas amostras de 1-2 g de tecido foliar e de raiz macerado na presença de nitrogênio líquido em almofariz de porcelana até a obtenção de um pó fino. Em seguida, o material foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 mL. Foram adicionados 800 µL de tampão de extração CTAB 2% (2g de CTAB, 8,18 g de NaCl, 0,74 g EDTA, 1,5g Tris HCL, 100 mL de água, pH 8,0), β-mercaptoetanol 0,2%, 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. Na sequência, foram adicionados 600 µL de clorofórmio isoamílico (CIA -24(clorofórmio):1(isoamil) e a mistura foi homogeneizada em vortex e centrifugada por 10 min a 15000 rpm, separando a fase orgânica da aquosa. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e adicionado a um novo tubo de 1,5 mL acrescido de 540 µL de isopropanol a -20°C. O conteúdo foi gentilmente misturado durante 1 minuto até formar um precipitado.

Após este período, a amostra foi centrifugada por 10 min a 15.000 rpm e o sobrenadante foi descartado, mantendo-se o precipitado que foi lavado duas vezes com etanol 80% por 5 minutos. Logo após, foi realizada uma centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante coletado em um novo tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 350 µL de isopropanol a -20°C. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 15.000 rpm e descartado o sobrenadante. O precipitado formado foi novamente lavado duas vezes com etanol 80% por 5 min.

Depois de descartar o etanol, o precipitado foi mantido à 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 quantificação e verificação de qualidade do DNA foram feitas em espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific).

### **3.6 Detecção do fitoplasma: condições de PCR**

Uma alíquota da amostra foi submetida ao teste de “nested”-PCR conforme descrito por Gundersen & Lee (1996), utilizando-se os pares de primers universais: R16mF2/R1, seguido de R16F2n/R2. A mistura de reação foi constituída por 1 µL de DNA e 24 µL de mistura de componentes (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). A reação foi então processada em termociclador (Techne Prime) ajustado para as seguintes etapas: 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 52°C durante 2 minutos, 72°C durante 3 minutos; 72°C durante 7 minutos. As amostras amplificadas por PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo corante Sybr safe. O marcador utilizado para corrida foi 1Kb DNA “Ladder”. A corrida eletroforética foi processada com uma corrente elétrica de 65 volts durante um período de 60 minutos, sendo os fragmentos genômicos visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

### **3.7 Análise estatística**

As análises foram realizadas no Software R, versão 4.1.2. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados originais foram utilizados para as medidas de comprimento de espiga, largura de espiga, número de fileiras por espiga e número de espigas por plantas, pois apresentaram distribuição normal. No entanto, para os critérios de

peso total de grãos por planta, altura da planta e diâmetro de colmo, o teste de normalidade foi inferior a 0,05 resultando em uma distribuição diferente da normal. Assim, os mesmos foram transformados em  $\sqrt{x+1}$  (raiz quadrada). Os dados foram submetidos ao teste de variância (ANOVA) e comparação de médias, utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).



## **4. RESULTADO E DISCUSSÃO**

### **4.1 Detecção do fitoplasma**

A presença do fitoplasma foi confirmada por PCR em todas as plantas submetidas à alimentação de cigarrinhas infectantes. Nas amostras coletadas da parte aérea da planta, foi possível detectar o fitoplasma em 72% das plantas analisadas. No entanto, o fitoplasma foi detectado em 100% das amostras coletadas de raiz. A presença de fitoplasma também foi confirmada nos insetos infectantes utilizados na inoculação das plantas de milho.

Os resultados negativos de ensaios de PCR podem ser atribuídos a fatores relacionados à concentração e distribuição do fitoplasma na planta (Lee et al., 1994). Apesar da alta sensibilidade das análises de PCR, a detecção do fitoplasma no tecido radicular foi mais evidente do que no tecido foliar, uma vez que, normalmente, a maior concentração do patógeno é encontrada nas raízes. Por outro lado, apesar do fitoplasma apresentar distribuição sistêmica no hospedeiro, o mesmo não possui distribuição uniforme, o que poderia explicar menor detecção nos tecidos foliares. No entanto, a ausência de detecção em, aproximadamente, 30% das amostras foliares não necessariamente significa que o patógeno não estava presente nestas plantas. Ainda com base nos ensaios de PCR, ficou evidente que a aplicação de silício não promoveu o efeito esperado na redução da incidência de plantas doentes, uma vez que todas as plantas inoculadas foram positivas para fitoplasma, quando amostras de raízes foram analisadas.

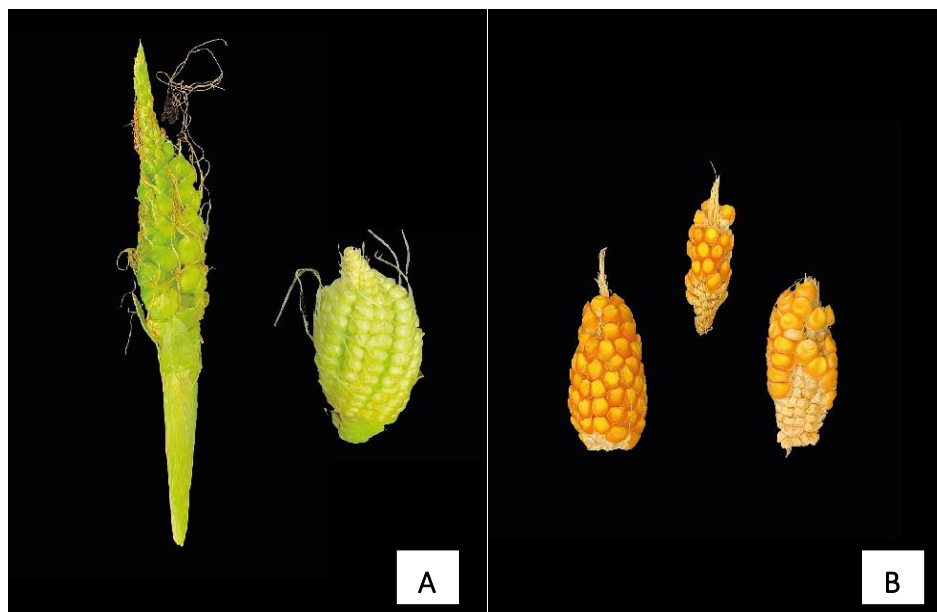
### **4.2 Sintomatologia**

As plantas de milho, de ambos os híbridos, submetidas à alimentação de cigarrinhas infectantes, apresentaram os primeiros sintomas a partir dos 30 dias após a inoculação. Inicialmente, os sintomas se caracterizaram por encurtamento de entrenós e estrias cloróticas nos bordos e ápice das folhas, as quais coalesceram e se tornaram avermelhadas com o passar do tempo (Figura 1). Outros sintomas tais como enfezamento da planta, colmos afilados, proliferação de espigas anômalas com granação deficiente e alta ocorrência de grãos deformados foram também observados (Figuras 1 e 2). Os sintomas apresentados pelas plantas inoculadas foram típicos de plantas de milho portadoras do fitoplasma do enfezamento, segundo relatos da literatura (Sabato & Oliveira, 2017). Sintomas da doença não foram observados nas plantas infestadas por insetos sadios ou naquelas que se desenvolveram na ausência do inseto.





**Figura 1.** Expressão de sintomas em plantas inoculadas com fitoplasma. A – Planta com redução de tamanho e encurtamento de entrenó; B – Proliferação de espigas; C – Avermelhamento em espigas anômalas; D – Áreas avermelhadas nos bordos de folhas.



**Figura 2.** Espigas produzida por plantas inoculadas com fitoplasma. A – Espigas com anomalias; B – Espigas deformadas de tamanho reduzido e com desenvolvimento anormal de grãos

Os sintomas das plantas controles, as quais não foram tratadas com silício, foram semelhantes em ambos os híbridos e tratamentos utilizados. Plantas que foram infestadas por insetos sadios e com ausência de insetos não mostraram sintomas relacionados à doença. Assim, ficou evidenciado que a aplicação de silício não demonstrou efeito positivo na expressão dos sintomas de plantas inoculadas.

### 4.3 Componentes de produção

#### 4.3.1 Altura de plantas

Os resultados referentes à altura de plantas tratadas com silício não demonstraram efeitos significativos quando comparados aquelas não tratadas (Tabela 1). Contudo, as plantas tratadas e não tratadas com silício inoculadas com o fitoplasma apresentaram redução significativa de altura, quando comparadas com as plantas sadias submetidas à alimentação de insetos não infectantes e plantas desenvolvidas na ausência de insetos (Tabela 2). Portanto, a aplicação de silício não impediu que ocorresse a redução no tamanho das plantas infectadas. Resultados semelhantes àqueles do presente estudo foram obtidos nos ensaios feitos por Da Silva Sandim et al. (2010), usando a mesma fonte de silício, nos quais a aplicação de deste mineral não se mostrou eficiente para garantir o desenvolvimento normal das plantas infectadas.

Contrariamente, nos experimentos conduzidos por Miranda et al. (2018) foi relatado um incremento na altura de plantas que receberam tratamento com silício.

**Tabela 1.** Altura de plantas (cm) de milho dos híbridos H1 (suscetível) e H2 (tolerante) crescidas na ausência de insetos, e submetidas à alimentação de insetos infectantes e insetos sadios. Nos ensaios foram usadas plantas não tratadas e plantas tratadas com silício, nas dosagens 1 (D1) e 2 (D2).

Tratamentos	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle H1	110	146	140
H1 D1	120	160	168
H1 D2	119	160	152
Controle H2	131	142	146
H2 D1	133	150	150
H2 D2	121	170	160

**Tabela 2.** Altura de plantas (cm) de milho tratadas e não tratadas com silício crescidas na ausência de insetos, e submetidas à alimentação de insetos infectantes e de insetos sadios

Inseto	Altura (cm)
Infectante	122 b
Sadio	155 a
Ausente	153 a

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

#### 4.3.2 Diâmetro de colmo

O diâmetro de colmo não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com e sem silício (Tabela 3). Os dados deste estudo são concordantes com as análises de Rodrigues et al. (2019), nas quais plantas de milho tratadas com silício não mostraram médias superiores quando comparadas com as plantas não tratadas. Similarmente, a aplicação de silício também promoveu não alteração de diâmetro de colmo em experimentos conduzidos por Freitas et al. (2011) e Miranda et al. (2018). O nutriente é constituinte da parede celular, tendo função nos processos de lignificação; no entanto, o excesso de silício pode afetar o crescimento normal da planta, afetando a expansão celular (Fleck et al., 2011).

**Tabela 3.** Diâmetro de colmo (cm) de plantas de milho crescidas na ausência de insetos, e plantas submetidas à alimentação de insetos infectantes e insetos sadios. No ensaio foram utilizados os híbridos H1 (suscetível) e H2 (tolerante) e aplicação de silício nas dosagens (D1) e (D2)

Tratamentos	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
<b>Controle H1</b>	1,0	1,2	1,3
<b>H1 D1</b>	1,2	1,2	1,3
<b>H1 D2</b>	1,0	1,2	1,3
<b>Controle H2</b>	0,9	1,4	1,3
<b>H2 D1</b>	1,1	1,2	1,3
<b>H2 D2</b>	1,1	1,1	1,1

### 4.3.3 Número de espigas por planta

Espigas produzidas por plantas submetidas à alimentação de cigarrinhas infectantes apresentaram tamanho reduzido, enchimento de grão irregular e anomalia do tipo virescência. No entanto, quanto ao número de espigas produzidas, não houve diferença significativa entre as dosagens de silício utilizadas, bem como entre as plantas que receberam e que não receberam silício (Tabela 4). As análises mostraram que plantas infectadas produziram, em média, uma espiga a mais quando comparadas com as plantas sadias, indicando a ocorrência de significância estatística quanto a estes tratamentos, em plantas tratadas e não tratadas com silício (Tabela 5).

**Tabela 4.** Número de espigas produzidas por plantas de milho dos híbridos H1 (suscetível) e H2 (tolerante) crescidas na ausência de insetos, e plantas submetidas à alimentação de insetos infectantes e sadios. Nos ensaios foram usadas plantas não tratadas e plantas tratadas com silício nas dosagens 1 (D1) e 2 (D2)

Tratamentos	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
<b>Controle H1</b>	2,0	1,2	1,0
<b>H1 D1</b>	2,3	1,3	1,3
<b>H1 D2</b>	2,0	1,5	1,0
<b>Controle H2</b>	3,3	1,3	1,5
<b>H2 D1</b>	2,8	1,5	1,3
<b>H2 D2</b>	2,4	1,5	1,5

**Tabela 5.** Número de espigas produzidas por plantas de milho tratadas e não tratadas com silício crescidas na ausência de insetos, e plantas submetidas à alimentação de insetos infectantes e sadios

<b>Inseto</b>	<b>Número de espigas</b>
<b>Infectante</b>	2,4 b
<b>Sadio</b>	1,4 a
<b>Ausente</b>	1,3 a

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

Os resultados obtidos não concordam com aqueles publicados por Almeida (2020) e Martins (2021), os quais observaram não haver diferença significativa quanto ao número de espigas produzidas por plantas inoculadas e não inoculadas com o fitoplasma. Por outro lado, Toffanelli (2001) conduziu trabalhos de mesma natureza e relatou que plantas portadoras de fitoplasma apresentaram aumento significativo no número de espigas mal formadas. Esta discordância pode ser atribuída ao uso de distintos genótipos de milho nos experimentos realizados pelos diferentes autores aqui mencionados.

#### **4.3.4 Comprimento e diâmetro de espiga**

No experimento não houve diferença significativa quanto ao comprimento das espigas quando analisada a influência do tratamento com silício (Tabela 6). No entanto, quando comparadas as espigas de plantas tratadas e não tratadas com silício infectadas com o fitoplasma, com aquelas produzidas por plantas não infectadas, houve redução significativa no comprimento das espigas (Tabela 7).

**Tabela 6.** Comprimento de espigas (cm) produzidas por plantas de milho dos híbridos H1 (suscetível) e H2 (tolerante) crescidas na ausência de insetos, e submetidas à alimentação de insetos infectantes e insetos sadios. Nos ensaios foram usadas plantas não tratadas e plantas tratadas com silício, nas dosagens 1 (D1) e 2 (D2)

Tratamentos	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
Controle H1	8,4	9,8	11,3
H1 D1	7,6	11,0	11,3
H1 D2	7,0	11,5	11,4
Controle H2	7,7	9,2	11,9
H2 D1	8,4	9,7	9,4
H2 D2	8,8	9,4	9,7

**Tabela 7.** Comprimento de espigas (cm) produzidas por plantas de milho tratadas e não tratadas com silício crescidas na ausência de insetos e plantas submetidas à alimentação de insetos infectantes e sadios

Inseto	Comprimento (cm)
Infectante	8,0 b
Sadio	10,1 a
Ausente	10,8 a

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

Similarmente aos resultados dos experimentos nos quais foram avaliados o comprimento de espigas, a medida do diâmetro também não revelou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 8). Contudo, plantas tratadas e não tratadas com silício portadoras de fitoplasma inoculado com cigarrinhas infectantes apresentam redução significativa no diâmetro das espigas, quando comparadas com espigas provenientes de plantas sadias (Tabela 9). Estes resultados mostraram claramente o efeito negativo do patógeno sobre o desenvolvimento das plantas infectadas.

**Tabela 8.** Diâmetro de espigas (cm) produzidas por plantas de milho dos híbridos H1 (suscetível) e H2 (tolerante), crescidas na ausência de insetos, e plantas submetidas à alimentação de insetos infectantes e sadios. Nos ensaios foram usadas plantas não tratadas e plantas tratadas com silício, nas dosagens 1 (D1) e 2 (D2).

Tratamentos	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
<b>Controle H1</b>	2,7	3,7	3,5
<b>H1 D1</b>	2,3	3,2	3,1
<b>H1 D2</b>	2,4	3,1	3,4
<b>Controle H2</b>	2,8	3,6	4,3
<b>H2 D1</b>	2,0	3,9	3,3
<b>H2 D2</b>	2,4	3,5	3,6

**Tabela 9.** Diâmetro de espigas (cm) produzidas por plantas de milho tratadas e não tratadas com silício crescidas na ausência de insetos e plantas submetidas à alimentação de insetos infectantes e sadios

Inseto	Diâmetro (cm)
<b>Infectante</b>	2,4 b
<b>Sadio</b>	3,5 a
<b>Ausente</b>	3,5 a

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

Em concordância com os resultados obtidos no presente trabalho, Da Silva Sandim et al. (2010) e Freitas et al. (2011) relataram que a aplicação de silício não produziu alteração no diâmetro e comprimento de espigas. Ao contrário, o emprego de silício como nutriente promoveu aumento no tamanho de espigas produzidas por plantas que receberam este mineral em ensaio desenvolvido por Miranda et al. (2018).

#### 4.3.5 Número de fileiras de grãos por espiga e peso total de grãos

As análises dos dados referentes ao número de fileiras de grãos por espiga e peso total de grãos não revelaram diferenças significativas para os diversos tratamentos componentes do ensaio (Tabela 10 e 11). Os tratamentos envolvendo a aplicação de silício não produziram os efeitos esperados sobre o controle do patógeno, nem mostrou incremento no número de grãos por fileira e peso de grãos. Mais uma vez, foi comprovado os danos resultantes da presença do

fitoplasma nas plantas de milho tratadas e não tratadas com silício, evidenciados pela significativa redução do número de fileiras de grãos nas espigas, bem como no peso de grãos (Tabelas 12 e 13). O número de fileiras foi drasticamente reduzido em 45% nas plantas submetidas à alimentação de insetos infectantes, comparado com as plantas saudáveis livres do fitoplasma (Tabela 12). De modo semelhante, a produção de grãos de plantas infectadas sofreu redução significativa de 40% em relação às plantas não portadoras do patógeno (Tabela 13.)

**Tabela 10.** Número de fileiras de grãos por espigas produzidas por plantas de milho dos híbridos H1 (suscetível) e H2 (tolerante) crescidas na ausência de insetos, e submetidas à alimentação de insetos infectantes e insetos saudáveis. Nos ensaios foram usadas plantas não tratadas e plantas tratadas com silício, nas dosagens 1 (D1) e 2 (D2)

Tratamentos	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
<b>Controle H1</b>	9,0	12,6	12,3
<b>H1 D1</b>	8,9	11,3	14,8
<b>H1 D2</b>	7,4	12,5	11,8
<b>Controle H2</b>	6,0	13,5	14,0
<b>H2 D1</b>	7,3	14,8	14,3
<b>H2 D2</b>	5,8	14,3	14,8

**Tabela 11.** Peso total de grãos (g) por plantas de milho dos híbridos H1 (suscetível) e H2 (tolerante) crescidas na ausência de insetos, e submetidas à alimentação de insetos infectantes e insetos saudáveis. Nos ensaios foram usadas plantas não tratadas e plantas tratadas com silício, nas dosagens 1 (D1) e 2 (D2).

Tratamentos	Inseto		
	Infectante	Sadio	Ausente
<b>Controle H1</b>	23,5	55,0	54,0
<b>H1 D1</b>	43,5	58,5	48,0
<b>H1 D2</b>	29,0	50,0	71,0
<b>Controle H2</b>	36,5	95,0	88,5
<b>H2 D1</b>	34,2	82,5	65,5
<b>H2 D2</b>	30,5	67,0	69,5



**Tabela 12.** Número de fileiras de grãos por espigas produzidas por plantas de milho tratadas e não tratadas com silício crescidas na ausência de insetos, e de plantas submetidas à alimentação de insetos infectantes e sadios

<b>Inseto</b>	<b>Nº de fileiras</b>
<b>Infectante</b>	7,4 b
<b>Sadio</b>	13,1 a
<b>Ausente</b>	13,6 a

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

**Tabela 13.** Peso total de grãos (g) produzidos por plantas de milho tratadas e não tratadas com silício crescidas na ausência de insetos, e de plantas submetidas à alimentação de insetos infectantes e sadios

<b>Inseto</b>	<b>Peso de grãos (g)</b>
<b>Infectante</b>	32,9 b
<b>Sadio</b>	68,0 a
<b>Ausente</b>	66,1 a

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

Em ensaios semelhantes àqueles aqui realizados, Rodrigues et al. (2019) relataram que a aplicação de silício em plantas de milho promoveu aumento no número de fileiras, o que gerou maior produtividade. Entretanto, experimentos conduzidos por Martins (2021) revelaram resultados concordantes com aqueles obtidos no presente trabalho, os quais mostraram ausência de diferença significativa entre o número de fileiras de grãos produzidas por plantas tratadas e não tratadas com silício. Em relação aos danos causados pelo fitoplasma, os relatos de Toffaneli & Bedendo (2002) estão em sintonia com o atual estudo, pois estes autores reportaram que plantas de milho inoculadas com o fitoplasma apresentaram redução de até 50% no número de fileiras por espigas, quando comparadas com plantas livres do patógeno.

O silício aplicado como nutriente na cultura do milho resultou em aumento significativo na produção de grãos pelas plantas que receberam o tratamento (Stephano et al., 2020; Lourenço et al., 2017). Os citados autores também relataram que o incremento na produtividade de grãos foi proporcional ao aumento da dosagem de silício. Os resultados observados por Martins (2021) são concordantes aqueles obtidos no presente estudo, pois mostraram que o silício aplicado tanto via solo, quanto via foliar, não inibiu os efeitos danosos da infecção ocasionada pelo agente do enfezamento vermelho. As pesquisas conduzidas por Toffaneli (2001) revelaram redução significativa no peso de grãos produzidos por plantas infectadas pelo fitoplasma, em concordância com os resultados aqui obtidos. A menor

rentabilidade de plantas infectadas pelo fitoplasma é condicionada pela indução de alterações citológicas e fisiológicas provocadas pelo patógeno, as quais ocasionam um mal funcionamento no transporte de fotoassimilados (Musetti et al., 2013).



## 5. CONCLUSÕES

A aplicação de silício não resultou em êxito para minimizar os danos causados pelo fitoplasma, agente do enfezamento vermelho, em plantas de milho;

A detecção do patógeno foi obtida com maior eficácia nas amostras retiradas dos tecidos do sistema radicular.

O silício é um nutriente com potencial para indução de resistência a doenças e, embora não tenha mostrado efeito positivo no presente trabalho, novos experimentos devem ser realizados buscando explorar este potencial para o patossistema milho-fitoplasma.



## REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. MAPA, 2022. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acessado em janeiro de 2022.
- Albuquerque, F. A. D.; Borges, L.; Iacono, T. O. D. O.; Crubelati, N. C. D. S.; Singer, A. D. C. (2006) Eficiência de inseticidas aplicados em tratamento de sementes e em pulverização, no controle de pragas iniciais do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo** 5:15-25.
- Almeida, C. A. (2020) **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**. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Bai, X.; Zhang, J.; Ewing, A.; Miller, S. A.; Jancso Radek, A.; Shevchenko, D. V.; Tsukerman, K.; Walunas, T.; Lapidus, A.; Campbell, J.W.; Hogenhout, S. A. (2006) Living with Genome Instability: The Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts. **Journal of Bacteriology** 188:3682–3696.
- Barros, F.C.; Sagata, E.; Ferreira, L. C. C.; Juliatti, F. C. (2010) Indução de resistência em plantas a fitopatógenos. **Bioscience Journal**, 26:231-239.
- Bascope, B.Q.; Galindo, J.A. (1981). Natureza micoplasmica de Ia raza "Mesa Central dei Achaparramiento" dei maiz. **Revista Fitopatologia**, v.16, p. 29-33.
- Bedendo, I. P.; (2018) Fitoplasmas e espiroplasmas. In: Amorim, L.; Rezende J. A. M.; Bergamim Filho, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres. 1:181-190.
- Bedendo, I. P.; LOPES, J. R. S. (2019); Impact and management of major phytoplasma diseases in Brazil. In. Olivier, C.Y.; Dumonceaux, T. J.; Perez-Lopes, E. (Ed.). **Sustainable management of Phytoplasma Diseases in Crops Grown in Tropical Belt- Biology and Detection**. Springer, Switzerland. p. 215-268.
- Bélanger, R. R.; Benhamou, N.; Menzies, J. G. (2003) Cytological Evidence of an Active Role of Silicon in Wheat Resistance to Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). **Phytopathology** 93:402-412.
- Bergamaschi, H.; Matzenauer, R. (2014) **O milho e o clima**. Emater/RS – Ascar, p. 83-84.
- Bertaccini, A.; Duduk, B. (2009) Phytoplasma and phytoplasma diseases: review of recent research. **Phytopathologia Mediterranea**, 48:355-378.

- Cai, K.; Gao, D.; Luo, S.; Zeng, R.; Yang, J.; Zhub, X. (2008) Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. **Physiologia Plantarum**, 134:324–333.
- Chang, S. H.; Tan, C. M.; Wu, C. T.; Lin, T. H.; Jiang, S. Y.; Liu, R. C.; Tsai, M. C.; Su, L. W.; Yang, J. Y. (2018) Alterations of plant architecture and phase transition by the phytoplasma virulence factor SAP11. **Journal of Experimental Botany** 69:5389–5401.
- Coelho, A. M. (2006) **Nutrição e adubação do milho**. Embrapa Milho e Sorgo
- Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2020). **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acessado em dezembro de 2022.
- Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2023). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/910-Milho>. Acessado em janeiro de 2023.
- Contini, E.; Mota, M. M.; Marra, R.; Borghi, E.; Miranda, R. A.; Silva, A. F.; Silva, D. D.; Machado, J. R. A.; Cota, L. V.; Costa, R. V.; Mendes, S. M.; (2019) **Milho: caracterização e desafios tecnológicos**. Embrapa. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195075/1/Milho-caracterizacao.pdf>>. Acessado em janeiro de 2022.
- Costa, A. S.; Kitajima, E. W.; Arruda, S. C. (1971) Molestia de vírus e de micoplasma do milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v.4, n.4, p. 39-41.
- Da Silva Sandim, A.; Ribon, A. A.; Diogo, L. O.; Savi, M. A. (2010) Doses de silício na produtividade do milho (*Zea mays* L.) híbrido simples na região de Campo Grande–MS. **Revista Cultivando o Saber**, 3:171-178.
- Datnoff, L. E.; Deren, C. W.; Snyder, G. H.; (1997) Silicon fertilization for rice disease management in Florida. **Crop Protection** 16:525-531.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L.; (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry**, New York 19:11-15.
- Fancelli, A. L.; Dourado Neto, D. (2004) **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária.
- Food and Agriculture Organization - FAO (2020). Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>. Acessado em Dezembro 2022.
- Fleck, A.T.; Nye, T.; Reppening, C.; Stahl, F.; Zahn, M.; Schenk, M. K. (2011) Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Experimental Botany**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3060683>. Acesso em janeiro de 2022

- Freitas, L. B.; Coelho, E. M.; Maia, S. C. M.; Silva, T. B. (2011) Adubação foliar com silício na cultura do milho. **Revista Ceres**, Viçosa 58:262-267.
- Gasparich, G. E. (2010) Spiroplasmas and phytoplasmas: Microbes associated with plant hosts. **Biologicals**. 38:193–203.
- Gordon, D. T.; Knoke, J. K.; Scott, G. E. (1981). Virus and viruslike diseases of maize in the United States. **Southern Cooperative Series Bulletin**, v. 247, p. 110-123.
- Gundersen, D. E.; Lee, I. M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. **Phytopathology Mediterranea**, v. 35, p. 144-151.
- Hogenhout, S. A.; Loria, R. (2008). Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**. 11:449–456.
- Hoshi, A.; Oshima, K.; Kakizawa, S.; Ishii, Y.; Ozeki, J.; Hashimoto, J.; Kotmatsu, K.; Kagiwada, S.; Yamai, Y.; Namba, S. (2009) A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA** 106:6416–6421.
- Huang, W.; Reyes-Caldas, P.; Mann, M.; Seifbarghi, S.; Kahn, A.; Almeida, R. P. P.; Béven, L.; Heck, M.; Hogenhout, S. A.; Coaker, G. (2020). Bacterial Vector-borne Plant Diseases: Unanswered Questions and Future Directions. **Molecular Plant**. 13:1379–1393.
- IRPCM (2004) “*Candidatus* Phytoplasma”, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 54:1243–1255.
- Iwabuchi, N.; Maejima, K.; Kitazawa, Y.; Miyatake, H.; Nishikawa, M.; Tokuda, R.; Hiroaki, K.; Akio, M.; Takamichi, N.; Kenro, O.; Yasuyuki, Y.; Namba, S. (2019) Crystal structure of phyllogen, a phyllody-inducing effector protein of phytoplasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 513:952–957.
- Junqueira, A. C. B.; Bedendo, I. P.; Pascholati, S. F. (2011) Effect of phytoplasma infection on the activity of peroxidase,  $\beta$ -1,3 glucanase and chitinase in corn plants. **Summa Phytopathologica**. 37:194–198.
- Kozaka, T. (1965) Ecology of *Pellicularia* sheath-blight of rice plant and its chemical control. **Japanese Journal of Phytopathology** , 31:179-185.
- Kube, M.; Mitrovic, J.; Duduk, B.; Rabus, R.; Seemüller, E. (2012) Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. **The Scientific World Journal** 1–25.
- Lee, I. M.; Davis, R. E.; Gundersen-rindal, D. E. (2000) Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, 54:221-225.



- Lee, I. M.; Gundersen-rindal, D. E.; Hammond, W.; Davis, R. E. (1994) 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** 84:559-566.
- Lee, I. M.; Gundersen-rindal, D. E.; Bertaccini, A. (1998) Phytoplasma: ecology and genomic diversity. **Phytopathology**, 88:1359-1366.
- Liang, Y.; Nikolic, M.; Belanger, R.; Gong, H.; SONG, A. (2015) Silicon and insect pest resistance. In: **Silicon in Agriculture**. Springer, Dordrecht.
- Lopes, J. R. S.; Oliveira, C. M. (2004) 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 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. (2017) Induction of resistance to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (Lepidoptera: Noctuidae) in transgenic and conventional corn plants. **Australian Journal of Crop Science**, 11:1176-1180.
- Madden, L. V.; Nault, L. R. (1983) Differential pathogenicity of corn stunting mollicutes to leafhopper vectors in *Dalbulus* and *Baldulus* species. **Phytopathology**. 73:1608–1614.
- Maejima, K.; Oshima, K.; Namba, S. (2014) Exploring the phytoplasmas, plant pathogens bacteria. **Journal of General Plant Pathology**, 80:210-221.
- Marcone, C. (2014) Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. **Annals of Applied Biology** 165:199-221.
- Martins, T. V. (2021). **Avaliação do uso de silício no patossistema milho-fitoplasma em condições experimentais**. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Massola Junior, N. S. (2001) Enfezamentos vermelho e pálido: doenças em milho causadas por mollicutes. **Semana de Ciências Agrárias** 22:237-243.
- Massola Junior, N. S.; Bedendo, I.P.; Amorim, L.; Lopes, J. R. S. (1999) Quantificação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, 24:136-142.
- MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** (2023). Disponível em: [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acessado em março de 2023.
- Meneses, A. R.; Querino, R. B.; Oliveira, C. M.; Maia, A. H. N.; Silva, P. R. R. (2016) Seasonal and vertical distribution of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) in Brazilian corn fields. **Florida Entomologist**. 99:750–754.

- Miché, L.; Battistoni, F.; Gemmer, S.; Belghazi, M.; Reinhold-Hurek, B. (2018) Host dependent expression of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* hydrogenase is controlled at transcriptional and post-transcriptional levels in legume nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 19:115–122.
- Minato, N.; Himeno, M.; Hoshi, A.; Maejima, K.; Komatsu, K.; Takebayashi, Y.; Kasahara, H.; Yusa, A.; Yamaji, Y.; Oshima, O.; Kamiya, Y.; Namba, S. (2014) The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. **Scientific Reports**. 4:1–7.
- Miranda, P.S.; Moraes, T. R.; dos Santos, J. R. E.; Carvalho, F. D.; Viana, J. P.; Pérez-Maluf, R. (2018) Aplicação de silício na cultura do milho. **Revista de Ciências Agroambientais** 16:1-6.
- Môro, G. V.; Fritsche-Neto, R. (2015) Importância e uso do milho no Brasil. In: Galvão, J. C. C.; Borem, A.; Pimentel, M. A. G. (Ed.). **Milho: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Editora UFV, 09-25.
- Moya-Raygoza, G.; Nault, L. R. (1998) Transmission Biology of Maize Bushy Stunt Phytoplasma by the Corn Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**. 91:668–676.
- Moya-Raygoza, G.; Hogenhout, S. A.; Nault, L. R. (2007) Habitat of the corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) during the dry (winter) season in Mexico. **Environmental Entomology**. 36:1066–1072.
- Musetti, R.; Buxa, S. V.; De Março, F.; Loshi, A.; Polizzotto, R.; Kogel, K. H.; Van bel, A. J. E. (2013) Phytoplasma-triggered Ca<sup>2+</sup> influx is involved in sieve-tube blockage. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 26:379-386.
- Naidoo, P.V.; Mcfarlane, S.; Keeping, M. G.; Caldwell, P. M. (2009) Deposition of silicone 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**, 82:542-546.
- Namba, S. (2019). Molecular and biological properties of phytoplasmas. **Proceedings of the Japan Academy**, Series B. 95:401–418.
- Nault, L. R.; (1980) Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**. 70:659-662.
- Nault, L. R.; Delong, D. M. (1980) Evidence for Co-evolution of leafhoppers in the genus *Dalbulus* (Cicadellidae: Homoptera) with maize and its ancestors. **Annals of the Entomological Society of America**. 73:349–353.

- Nieuwenhove, G. A.; Van Frías, E. A.; Virla, E. G. (2016) Effects of temperature on the development, performance and fitness of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* (DeLong) (Hemiptera: Cicadellidae): Implications on its distribution under climate change. **Agricultural and Forest Entomology**. 18:1–10.
- Oliveira, C. M.; Frizzas, M. R.; Oliveira, E. (2020) Overwintering plants for *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) adults during the maize off-season in central Brazil. **International Journal of Tropical Insect Science**. 40:1105–1111.
- Oliveira, C. M.; Lopes, J. R. S.; Nault, L. R. (2013a) Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off season in Brazil. **Entomology Experimentalis et Applicata** 147:141-153.
- Oliveira, C. M.; Oliveira, E.; Canuto, M.; Cruz, I. (2007) Controle químico da cigarrinha-do-milho e incidência dos enfezamentos causados por mollicutes. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. 42:297–303.
- Oliveira, C. M.; Oliveira, E.; Souza, I. R. P.; Alves, E.; Dolezal, W.; Paradell, S.; Lenicov, A. M. M. R.; Frizzas, M. R. (2013b) Abundance and species richness of leafhoppers and planthoppers (Hemiptera: Cicadellidae and Delphacidae) in Brazilian maize crops. **Florida Entomologist**. 96:1470–1481.
- Oliveira, C. M.; Querino, R. B.; Frizzas, M. R. (2017) Cigarrinhas na cultura do milho no Brasil. In **Doenças do milho: insetos-vetores, mollicutes e vírus**, eds. Oliveira, C. M.; Sabato, E. O. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 72–96.
- Oliveira, E.; Paiva, F. A. (2004) 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 133-146.
- Oliveira, E.; Ternes, S.; Vilaumi, R.; Landau, E. C.; Oliveira, C. M. (2015) Abundance of the insect vector of two different mollicute plant pathogens in the vegetative maize cycle. **Phytopathogenic Mollicutes** 5:117-118.
- Oliveira, E.; Waquil, J. M.; Fernandes, F. T.; Paiva, E.; Resende, R. O.; Kitajima, E. W.; (1998) **Enfezamento pálido e enfezamento vermelho na cultura do milho no Brasil Central**. Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE).
- Orlovskis, Z.; Hogenhout, S. A. (2016) A bacterial parasite effector mediates insect vector attraction in host plants independently of developmental changes. **Frontiers in Plant Science**. 7:1–9.

- Orlovskis, Z.; Canale, M. C.; Haryono, M.; Lopes, J. R. S.; Kuo, C. H.; Hogenhout, S. A. (2017) A few sequence polymorphisms among isolates of maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. **Annals of Botany**. 119:869–884.
- Oshima, K.; Kakizawa, S.; Nishigawa, H.; Jung, H. Y.; Wei, W.; Suzuki, S.; Arashida, R.; Nakata, D.; Miyata, S. I.; Ugaki, M.; Shigetou Namba, S. (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. **Nature Genetics**. 36:27–29.
- Oshima, K.; Kakizawa, S.; Arashida, R.; Ishii, Y.; Hoshi, A.; Hayashi, Y.; Kagiwada, S.; Namba, S. (2007) Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of *Candidatus Phytoplasma asteris*. **Molecular Plant Pathology**. 8:481–489.
- Oshima, K.; Maejima, K.; Namba, S. (2013) Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. **Frontiers in Microbiology**. 4:1–8
- Paolacci, A. R.; Catarcione, G.; Ederli, L.; Zadra, C.; Pasqualini, S.; Badiani, M.; Musetti, R.; Santi, S.; Ciaffi, M. (2017) Jasmonate-mediated defense responses, unlike salicylate mediated responses, are involved in the recovery of grapevine from bois noir disease. **BMC Plant Biology**. 17:118.
- Pecher, P.; Moro, G.; Canale, M. C.; Capdevielle, S.; Singh, A.; MacLean, A.; Sugio, A.; Kuo, C. H.; Lopes, J. R. S.; Hogenhout, S. A. (2019) Phytoplasma SAP11 effector destabilization of TCP transcription factors differentially impact development and defence of *Arabidopsis* versus maize. **PLoS Pathogens**. 15:1–27.
- Pozza, E. A.; Pozza, A. A. A.; Botelho, D. M. S. (2015) Silicon in plant disease control. **Revista Ceres** 62:323-331.
- Prabhu, A.S.; Barbosa Filho, M. P.; Datnoff, L. E.; Snyder, G. H.; Berni, R. F.; Rodrigues, F. A.; Dallagnol, L. J. (2012) Silicon reduces brown spot severity and grain discoloration on several rice genotypes. **Tropical Plant Pathology**, 37:409-414.
- Resende, R. S.; Rodrigues, F. A.; Gomes, R. J.; Nascimento, K. J. T. (2013) Microscopic and biochemical aspects of sorghum resistance to anthracnose mediated by silicone. **Annals of Applied Biology**, 163:114-123.
- Rodrigues, F. A.; Datnoff, L. E. (2015) **Silicon and plant diseases**. Cham: Springer international publishing.
- Rodrigues, L. A.; Oliveira, I. C.; Nogueira, G. A.; Silva, T. R. B.; Cândido, A. C. S.; Alves, C. Z. (2019) Coating seeds with silicon enhances the corn yield of the second crop. **Revista Caatinga**, 32:897-903.

- Roma, R. C. C. (2010) **Diversidade de fungos associados a manchas em sementes de arroz irrigado com aplicação de silicato de cálcio e cinza de casca de arroz**. Dissertação (Mestrado em Etiologia; Epidemiologia; Controle) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Sabato, E. O. (2017) 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 196-219.
- Sabato, E. O.; Oliveira, M. (2017) **Doenças em milho**: insetos-vetores, mollicutes e vírus. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 200-278.
- Saigo, M.; Golic, A.; Alvarez, C. E.; Andreo, C. S.; Hogenhout, S. A.; Mussi, M. A.; Drincovich, M. F. (2014) Metabolic regulation of phytoplasma malic enzyme and phosphotransacetylase supports the use of malate as an energy source in these plant pathogens. **Microbiology**. 160:2794–2806
- Shetty, R.; Frette, X.; Jensen, B.; Shetty, N. P.; Jensen, J. D.; Jørgensen, H. J. L.; Newman, M. A.; Christensen, L. P. (2011) Silicon-induced changes in antifungal phenolic acids, flavonoids, and key phenylpropanoid pathway genes during the interaction between miniature roses and the biotrophic pathogen *Podosphaera pannosa*. **Plant Physiology**, 157:2194-2295.
- Stephano, M. F.; Geng, Y.; Cao, G.; Wang, L.; Meng, W.; Meiling, Z. (2020) Effect of silicon fertilizer and straw return on the maize yield and phosphorus efficiency in Northeast China. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 52:116-127.
- Sugio, A.; Hogenhout, S. A. (2012) The genome biology of phytoplasma: Modulators of plants and insects. **Current Opinion in Microbiology**. 15:247–254.
- Sugio, A.; MacLean, A. M.; Kingdom, H. N.; Grieve, V. M.; Manimekalai, R.; Hogenhout, S. A. (2011) Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. **Annual Review of Phytopathology**. 49:175–195.
- Summers, C. G.; Newton, A. S.; Opgenorth, D. C. (2004) Overwintering of Corn Leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), and *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) in California's San Joaquin Valley. **Environmental Entomology**. 33:1644–1651.
- Toffanelli, C. M. (2001) **Efeito do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e da população de vetores infectivos sobre sintomas e componentes de produção**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- Toffanelli, C. M.; Bedendo, I. P. (2002). Efeito da população infetiva de *Dalbulus maidis* na produção de grãos e no desenvolvimento de sintomas do enfezamento vermelho do milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 82-86.
- Tomkins, M.; Kliot, A.; Marée, A. F.; Hogenhout, S. A. (2018) A multi-layered mechanistic modelling approach to understand how effector genes extend beyond phytoplasma to modulate plant hosts, insect vectors and the environment. **Current Opinion in Plant Biology**. 44:39–48.
- Toruño, T. Y.; Stergiopoulos, I.; Coaker, G. (2016) Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. **Annual Review of Phytopathology**. 54:419–441.
- Triplehorn, B. W.; Nault, L. R. (1985) Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the *Macrostelini*. **Annals of the Entomological Society of America**. 78:291–315.
- USDA – United States Department of Agriculture. **National agricultural statistics service:** Disponível em: <[https://www.nass.usda.gov/Statistics\\_by\\_Subject/index.php?sector=CROPS](https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_Subject/index.php?sector=CROPS)>. Acessado em dezembro de 2022.
- Vilanova, E. S.; Ramos, A.; de Oliveira, M. C. S.; Esteves, M. B.; Gonçalves, M. C.; Lopes, J. R. (2022) First report of a mastrevirus (Geminiviridae) transmitted by the corn leafhopper. *Plant Disease*, v. 106, n. 5, p. 1330-1333.
- Waquil, J. M.; Viana, P. A.; Cruz, I.; Santos, J. P. (1999) Aspectos da biologia da cigarrinhado-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 28:413–420.
- Weintraub, P. G.; Beanland, L. (2006) Insect vectors of phytoplasmas. **Annual Review of Entomology**. 51:91–111.
- Yan, C.; Xie, D. (2015) Jasmonate in plant defense: sentinel or double agent? **Plant Biotechnology Journal**. 13:1233–1240.
- Zanão Júnior, L. A.; Fontes, R. L. F.; Ávila, V. T. (2009a) Aplicação do silício para aumentar a resistência do arroz à mancha-parda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 44:203-206
- Zanão Junior, L.A.; Rodrigues, F. A.; Fontes, R. L. F.; Korndorfer, G. H.; Neves, J. C. L. (2009b) Rice resistance to brow spot mediated by silicone and its interaction whit manganese. **Journal of Phytopathology** 157:73-78.