



DOENÇAS EM MILHO

INSETOS-VETORES, MOLICUTES E VÍRUS

Charles Martins de Oliveira
Elizabeth de Oliveira Sabato
Editores Técnicos



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

DOENÇAS EM MILHO

Insetos-vetores, mollicutes e vírus

*Charles Martins de Oliveira
Elizabeth de Oliveira Sabato*
Editores Técnicos

Embrapa
Brasília,DF
2018

Embrapa Milho e Sorgo

Rodovia MG-424, km 45

Caixa Postal 151

35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

www.embrapa.br

Unidade responsável pelo conteúdo

Embrapa Milho e Sorgo

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Sidney Netto Parentoni*

Secretária-executiva: *Elena Charlotte Landau*

Membros: *Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges*

Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso

Campanha, Roberto dos Santos Trindade, Rosângela Lacerda de Castro

Embrapa

Parque Estação Biológica (PqEB)

Av. W3 Norte (final)

70770-901 Brasília, DF

Fone: (61) 3448-4236

Fax: (61) 3448-2494

www.embrapa.br/livraria

livraria@embrapa.br

Responsável pela edição

Secretaria-Geral

Coordenação editorial: *Alexandre de Oliveira Barcellos, Heloiza Dias da Silva, Nilda Maria da Cunha Sette*

Supervisão editorial: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Revisão de texto: *Antonio Claudio da Silva Barros*

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro, Rejane Maria de Oliveira*

Capa, projeto gráfico e editoração eletrônica: *Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Fotos da capa: *Elizabeth de Oliveira Sabato, Charles Martins de Oliveira*

Supervisão editorial do e-book: *Wyviane Carlos Lima Vidal*

Projeto gráfico e editoração eletrônica do e-book: *Paula Cristina Rodrigues Franco, Leandro Sousa Fazio*

Revisão do e-book: *Ana Maranhão Nogueira*

1ª edição

1ª impressão (2017): 1.000 exemplares

E-book (2018)

Todos os direitos reservados.

Para uso exclusivo de #NOME#. A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa

Doenças em milho : insetos-vetores, mollicutes e vírus / Charles Martins de Oliveira, Elizabeth de Oliveira Sabato, editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2018.

E-book : il. colour.

ISBN 978-85-7035-837-0

1. *Zea mays*. 2. Enfezamento do milho. 3. *Dalbulus maidis*. 4. Cigarrinhas. 5. Potyvírus. I. Oliveira, Charles Martins de. II. Sabato, Elizabeth de Oliveira. III. Embrapa Milho e Sorgo. IV. Título: Doenças em milho.

CDD 633.15

© Embrapa, 2018

Autores

Ana Luiza Castanheira

Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, professora do Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Belo Horizonte, MG

Andrea de Almeida Carneiro

Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Ciência de Plantas, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Antônio Marcos Coelho

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Solos e Nutrição de Plantas, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Assunta Bertaccini

Bióloga, doutora em Fitopatologia, professora associada da *Alma Mater Studiorum*, Universidade de Bolonha, Bolonha, Itália

Aurélio Ribeiro Meneses

Biólogo, mestre em Agronomia, pós-graduando da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI

Beatriz de Almeida Barros

Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Charles Martins de Oliveira

Engenheiro-agrônomo, doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Elcio de Oliveira Alves

Biólogo, mestre em Fitopatologia, cientista da Dupont Pioneer, Itumbiara, GO

Elena Charlotte Landau

Bióloga, doutora em Ecologia, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Eliane Aparecida Gomes

Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Elizabeth de Oliveira Sabato

Bióloga, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Erica Beatriz Luft Albarracin

Bióloga, Ph.D. em Ciências Biológicas, pesquisadora do CONICET, Divisão de Controle Biológico, PROIMI-Biotecnología, San Miguel de Tucumán, Argentina

Flavia França Teixeira

Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Frederico Alberto de Oliveira

Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, Professor da Universidade Federal de Sergipe, Campus do Sertão, Nossa Senhora da Glória, SE.

Isabel Regina Prazeres de Souza

Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Plant Science, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

João Herbert Moreira Viana

Engenheiro-agrônomo, doutor em Solos e Nutrição de Plantas, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

João Roberto Spotti Lopes

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Entomologia, professor titular da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP

Marina Regina Frizzas

Engenheira-agrônoma, doutora em Entomologia, professora da Universidade de Brasília, Brasília, DF

Newton Portilho Carneiro

Biólogo, Ph.D. em Biologia Molecular de Plantas, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Ranyse Barbosa Querino

Engenheira-agrônoma, doutora em Entomologia, pesquisadora da Embrapa Meio--Norte, Teresina, PI

Raphael Gustavo d'Almeida Vilamiu

Físico, doutor em Matemática, professor do Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca (Cefet/RJ), Angra dos Reis, RJ

Serguei Triapitsyn

Biólogo, Ph.D. em Entomologia, pesquisador do Departamento de Entomologia, Universidade da Califórnia, Riverside, Califórnia, EUA

Sônia Ternes

Matemática, doutora em Engenharia Elétrica, pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, SP

Sylvia Morais de Sousa

Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Viviane Talamini

Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

Apresentação

Este livro contém informações destinadas ao cultivo do milho livre de doenças causadas por mollicutes e por vírus transmitidos por cigarrinhas e pulgões. Reflete aspectos da atuação da Embrapa no acompanhamento do sistema de produção do milho, com proposição contínua de soluções para o manejo de doenças e maximização da produtividade, contribuindo para o sucesso do agronegócio no território nacional.

Reconhecemos nele o resultado do trabalho de pesquisadores da Embrapa na geração de conhecimento sobre os agentes causais dessas doenças e os seus insetos-vetores, bem como a integração com outros especialistas que atuam nessa área, no País e em outros países.

As informações apresentadas neste livro destinam-se a técnicos que atuam diretamente na cadeia produtiva desse cereal, a pesquisadores, a professores e estudantes da área, ou de áreas correlatas. Abrangem outros países onde ocorrem essas doenças no milho, ou agentes causais dos mesmos grupos infectando outras espécies vegetais, em patossistemas similares.

Antônio Álvaro Corsetti Purcino
Chefe-Geral da Embrapa Milho e Sorgo

Prefácio

Molicutes (espiroplasma e fitoplasma) e vírus são agentes causais das doenças do milho denominadas enfezamentos e viroses, e são transmitidos por insetos-vetores.

Diversos capítulos deste livro tratam, de forma individualizada, sobre aspectos pertinentes a cada um dos principais componentes dos sistemas patológicos envolvendo a planta de milho, os molicutes e os vírus patogênicos a essa espécie vegetal, e seus insetos-vetores, considerando fatores que influenciam a incidência das doenças que causam, como época de semeadura e condições climáticas, danos na produção, e alternativas para seu controle ou para escape. Entre outros temas, alguns deles tratam da detecção dos molicutes, da taxonomia e biologia dos fitoplasmas, da fisiologia e metabolismo dos espiroplasmas, da biologia, ecologia e de técnicas para a criação da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis*, e da ocorrência de outras espécies de cigarrinhas, nessa cultura.

Outros capítulos tratam dos inimigos naturais de *D. maidis*, que é o principal inseto-vetor dos molicutes que infectam o milho, do seu controle químico e efeito na disseminação desses agentes patogênicos, da modelagem matemática da dispersão dessa cigarrinha e ocorrência de surtos epidêmicos dos enfezamentos, da resistência genética do milho a esses patógenos e metodologia para seleção de genótipos com genes de resistência, das perspectivas para desenvolvimento de tecnologias baseadas no RNAi e controle de doenças, e da identificação de possíveis causas de sintomas na

planta de milho e de danos na produção. Com relação aos vírus que infectam o milho, um dos capítulos trata das viroses presentes no Brasil, outro da detecção molecular e identificação das espécies de potyvirus do complexo do mosaico do milho e do sorgo, e outro sintetiza informações para possível identificação de viroses do milho ausentes do Brasil, em caso de sua introdução no território nacional.

Muitas informações aqui disponíveis foram geradas a partir de estudos científicos desenvolvidos pelos próprios autores e incluem resultados inéditos, e recém-obtidos.

Os autores elaboraram os capítulos da obra buscando dar aos leitores uma visão detalhada da complexidade do ciclo, da incidência, do diagnóstico e do manejo dessas doenças do milho disseminadas por insetos-vetores, que têm sido um grande desafio, causando danos expressivos, particularmente nas regiões quentes do território nacional, onde o milho é cultivado em mais de uma safra ao ano. Nossa expectativa é que a compreensão desses sistemas patológicos contribuirá para a adoção de estratégias que permitirão o cultivo do milho sempre sadio e produtivo.

Os editores

Capítulo 1

Enfezamentos do milho

Elizabeth de Oliveira Sabato



Enfezamentos: doenças causadas por mollicutes

Dois microrganismos da classe Mollicutes, comumente denominados mollicutes, são os agentes causais das doenças do milho denominadas enfezamentos: *Spiroplasma kunkelii* (Mollicutes-Spiroplasmataceae) (WHITCOMB et al., 1986) e Maize bushy stunt fitoplasma (MBS-fitoplasma) (BEDENDO et al., 1997). Esses microrganismos, geralmente referidos apenas por espiroplasma e por fitoplasma, são procariontes sem parede celular, e são transmitidos de forma persistente-propagativa por espécies de cigarrinhas (BASCOPE-QUINTANILLA, 1977; NAULT, 1980).

As cigarrinhas *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) e *D. elimatus* (Ball) (Hemiptera: Cicadellidae) são os insetos-vetores naturais desses patógenos, sendo *D. maidis* o seu vetor principal, no Brasil e em outros países das Américas (NAULT, 1980, 1990; OLIVEIRA et al., 2013a). Experimentalmente, a cigarrinha *Graminella nigrifrons* (Forbes) transmitiu espiroplasma e fitoplasma, e as espécies *Exitianus exitiosus* (Uhler) e *Stirellus bicolor* (Van Duzee) transmitiram apenas espiroplasma (NAULT, 1980). Recentemente, a espécie *Exitianus obscurinervis* (Stal) foi demonstrada como vetor experimental do *S. kunkelli* (CARLONI et al., 2011). Contudo, a importância epidemiológica dessas espécies de cigarrinhas na disseminação dos mollicutes na cultura do milho não tem sido demonstrada.

Além do milho, os teosintos, que ocorrem em apenas alguns países das Américas, são hospedeiros dos mollicutes (NAULT, 1980). Para *D. maidis*, além do milho, há relatos de sua ocorrência em teosintos (*Zea* spp.), e também já foi coletada em *Tripsacum* spp. e em *Euchlaena mexicana* Schrad (BARNES, 1954; NAULT; DELONG, 1980; NAULT, 1990), espécies vegetais que não ocorrem naturalmente no Brasil.

Embora tenha sido demonstrado que espécies da família Poaceae, como o capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq.), o capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea* (Link) Hitch) e a *Brachiaria decumbens* Stapf., que ocorrem no Brasil, podem ser, em baixa frequência, experimentalmente infectadas pelo MBS-fitoplasma (HAAS, 2010), a importância epidemiológica dessas espécies vegetais na perpetuação desse patógeno, na ausência do milho, também não tem sido demonstrada.

Assim, no Brasil, essencialmente o milho e a cigarrinha *D. maidis* são os hospedeiros dos mollicutes, que se perpetuam e se disseminam por meio da migração da cigarrinha *D. maidis*, de lavouras com plantas adultas doentes para lavouras com plântulas saudáveis (OLIVEIRA et al., 2002a).

Os dois tipos de enfezamentos causados por esses mollicutes: enfezamento-pálido (*corn stunt spiroplasma*) (Figura 1) e enfezamento-vermelho (*maize bushy stunt phytoplasma*) (Figura 2) foram descritos pela primeira vez no Brasil, na década de 1970, sendo esses patógenos observados por meio de microscopia eletrônica (COSTA et al., 1971; KITAJIMA; COSTA, 1972). Desde a década de 1990, no Brasil, o espiroplasma tem sido detectado também por teste sorológico ELISA e, ambos, espiroplasma e fitoplasma, detectados por teste de PCR (reação em cadeia da polimerase) (OLIVEIRA et al., 1998, 2002d; MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; BARROS et al., 2001). Por meio de sequenciamento do DNA, Bedendo et al. (1997) confirmaram a presença do MBS-fitoplasma em amostras de folhas de plantas de milho com enfezamento-vermelho, do Brasil.





Figura 1. Enfezamento-pálido.

Fotos: Elizabeth de Oliveira Sabato





Figura 2. Enfezamento-vermelho.

Fotos: Elizabeth de Oliveira Sabato

O enfezamento-pálido foi observado pela primeira vez em 1945, nos Estados Unidos da América, no vale do Rio Grande, Texas, e o enfezamento-vermelho, em 1950, no México (GORDON et al., 1981). Na década de 1970, foi obtido sucesso no cultivo do espiroplasma em meio de cultura axênica, e foi confirmado ser esse microrganismo o agente etiológico do enfezamento-pálido (DAVIS; WORLEY, 1973). De forma equivocada, ambas as doenças foram, por algum tempo, denominadas: corn stunt spiroplasma-raça Rio Grande (enfezamento-pálido), e corn stunt spiroplasma-raça Mesa Central (enfezamento-vermelho). Foi posteriormente demonstrado que o enfezamento-vermelho está associado à presença do MBS-fitoplasma nos tecidos da planta. Até o momento, não se obteve sucesso no cultivo in vitro do MBS-fitoplasma, o que tem impedido a comprovação do “postulado de Koch”, e confirmação *stricto sensu* desse microrganismo como agente etiológico do enfezamento-vermelho, como foi feito para o espiroplasma. Contudo, tem sido amplamente aceito que o MBS-fitoplasma é o agente etiológico do

enfezamento-vermelho (COSTA et al., 1971; BASCOPÉ-QUINTANILLA, 1977; NAULT; DELONG,1980; BEDENDO et al., 1997).

Tanto o milho quanto a cigarrinha *D. maidis* podem ser simultaneamente infectados por *S. kunkelii* e por MBS-fitoplasma sendo que a consistência da transmissão simultânea de ambos e a manifestação de sintomas característicos do enfezamento-pálido e/ou do enfezamento-vermelho variam para diferentes isolados, sob influência da temperatura ambiente (BASCOPÉ-QUINTANILLA, 1977; OLIVEIRA et al., 2007, 2015a). A temperatura ótima para a multiplicação do *S. kunkelii* in vitro é em torno de 30 °C (WHITCOMB et al., 1986).

Ao infectar as plântulas de milho, o espiroplasma multiplica-se primeiro nas raízes (GUSSIE et al., 1995). A dinâmica da infecção das plântulas de milho pelo fitoplasma não é conhecida, porém, esse molicute foi observado em grande quantidade em células das raízes de plantas de milho com enfezamento-vermelho, por Bascopé-Quintanilla (1977).

O espiroplasma

O espiroplasma (Figura 3A), o agente causal do enfezamento-pálido do milho, apresenta forma de filamento helicoidal, e possui motilidade. Pode ser observado no extrato da nervura central de folha de milho exibindo sintomas do enfezamento-pálido utilizando-se microscópio de contraste de fase, ou ao microscópio eletrônico de transmissão, em preparações com contrastação negativa, ou em secções de tecido infectado. Em observações de secções ultrafinas de tecido de folha de milho infectada, obtidas com ultramicrotomo,

os filamentos desse microrganismo apresentaram dimensões de 0,2 μ a 0,25 μ por 3 μ a cerca de 15 μ , com ondulações regulares, sendo encontrados corpos esféricos irregulares (0,4 a 0,6) ligados a alguns filamentos (DAVIS; WORLEY, 1973; WHITCOMB et al., 1986). Análises ultraestruturais das células de *S. kunkelii* nos tecidos da cigarrinha *D. maidis*, o inseto-vetor desse mollicute, mostraram a presença de protuberâncias semelhantes a “pili”, aparentemente relacionadas à movimentação desse microrganismo, e ao seu processo de conjugação (OZBEK et al., 2003).

O fitoplasma

O fitoplasma (Figura 3B) agente causal do enfezamento-vermelho do milho apresenta forma ovoide ou esférica. Em secções ultrafinas de tecidos de plantas de milho com enfezamento vermelho, incluindo folhas, colmo e raízes, os fitoplasmas foram observados em células do floema, algumas vezes agrupados dentro de uma membrana. Nas raízes dessas plantas foram observadas várias células repletas com esse microrganismo, presente também nas células das glândulas salivares de cigarrinhas infectantes. As dimensões desses fitoplasmas variaram entre 100 nm x 130 nm e 400 nm x 800 nm nas células vegetais, e entre 470 nm x 720 nm nas células das glândulas salivares das cigarrinhas (BASCOPÉ-QUINTANILLA, 1977).

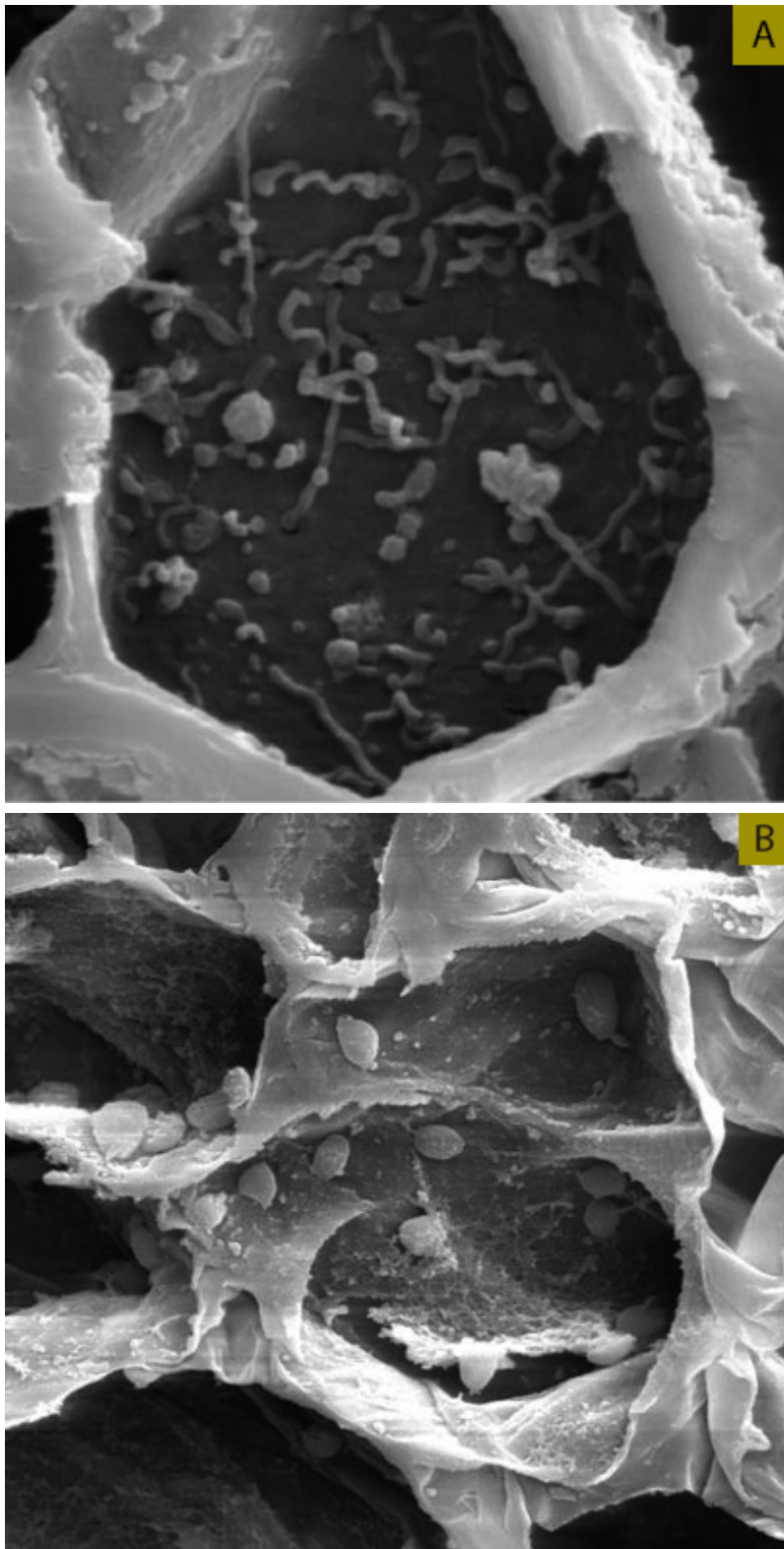


Figura 3. Espiroplasma (A) e fitoplasma (B) em células de milho.

Fotos: M. G. Martineli

Sintomas dos enfezamentos

Os sintomas dos enfezamentos manifestam-se caracteristicamente, e em maior intensidade, na fase de produção das plantas de milho, podendo se manifestar antes, ou na fase de florescimento, quando as plantas são cultivadas em vasos, e são descritos por vários autores (COSTA et al., 1971; BASCOPE-QUINTANILLA, 1977; NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 1998, 2015a; MASSOLA JÚNIOR et al., 1999).

De acordo com Bascopé-Quintanilla (1977), o enfezamento-pálido caracteriza-se pelas manchas cloróticas e independentes, produzidas na base das folhas que, posteriormente, coalescem e formam bandas grandes; os entrenós se desenvolvem menos e a planta tem a altura reduzida (“fica enfezada”); formam-se brotos nas axilas das folhas, e o colmo e as folhas adquirem cor avermelhada. O enfezamento-vermelho caracteriza-se pela severidade do “enfezamento” e pela maior intensidade da cor vermelha, que chega a ser púrpura nas folhas mais velhas, e por abundante perfilhamento nas axilas foliares e na base das plantas.

De acordo com estudo de Nault (1980), o primeiro sintoma da infecção de uma cultivar de milho-doce com MBS-fitoplasma foi clorose da margem das folhas do cartucho, seguida por avermelhamento das pontas das folhas mais velhas. As folhas subsequentes apresentaram clorose, avermelhamento, torção e deformações em níveis variáveis. Numerosos brotos surgiram nas axilas foliares e na base das plantas. As plantas infectadas desenvolveram menos raízes que as plantas saudas, e em condições de temperaturas altas (31 °C durante o dia e 25 °C durante a noite) morreram antes da maturidade. Entretanto, duas

outras cultivares de milho-doce, infectadas com esse patógeno, não apresentaram folhas vermelhas, e formaram menos brotos nas axilas foliares. As plantas mostraram severo encurtamento dos internódios e formaram numerosas espigas pequenas. As plantas infectadas com espiroplasma diferiram por apresentar estrias cloróticas características, estendendo-se da base em direção ao ápice das folhas e avermelhamento menos intenso que aquelas infectadas com fitoplasma. Contudo, em condições de temperaturas entre 27 °C durante o dia e 18 °C durante a noite, as plantas infectadas por esse patógeno não formaram as estrias cloróticas características, e apresentaram apenas amarelecimento e avermelhamento na base das folhas superiores.

Massola Júnior et al. (1999) também observaram a presença de folhas vermelhas em plantas de milho submetidas à inoculação com espiroplasma, além da presença das estrias cloróticas características da infecção por esse mollicute. Costa et al. (1971) observaram que plantas de milho infectadas com fitoplasma não apresentam drástica redução em altura e, em geral, não perfilham.

Os sintomas de enfezamentos observados em cultivares de milho melhoradas para a produção de grãos podem ser menos drásticos com relação à altura de plantas e ausência de perfilhamento, quando comparados aos sintomas descritos por esses autores. Em geral, essas cultivares de milho apresentam folhas avermelhadas, mas algumas delas apresentam apenas descolorações cloróticas, e secam precocemente (Figura 4) (OLIVEIRA et al., 1998, 2005).



Figura 4. Planta infectada por fitoplasma; clorose (cultivar que não avermelha).

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

É interessante observar que, tanto em plantas submetidas à inoculação com mollicutes, em condições controladas, quanto em plantas doentes, no campo, é possível notar descolorações entre as nervuras secundárias das folhas, que podem, ou não, tornar-se avermelhadas, posteriormente (Figura 5).



Figura 5. Descoloração entre nervuras secundárias e avermelhamento posterior.

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Não é possível diferenciar visualmente entre os dois tipos de enfezamento, exceto quando presentes os sintomas foliares característicos e inequívocos da infecção com espiroplasma (enfezamento-pálido), que são estrias cloróticas, tendendo ao branco, irregulares, que se estendem da base em direção ao ápice das folhas (Figura 6). Além disso, as plantas de milho podem ser simultaneamente infectadas com espiroplasma e com fitoplasma (OLIVEIRA et al., 2007, 2015a).



Figura 6. Estrias cloróticas esbranquiçadas, características da infecção por espiroplasma

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Frequentemente, no campo, a planta doente apresenta apenas folhas avermelhadas, marcadamente nas margens (Figura 7) e na parte apical, e clorose entre as nervuras secundárias. As margens das folhas podem secar.



Figura 7. Planta com enfezamento: folhas avermelhadas na ponta e na margem e espigas pequenas.

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

As espigas das plantas de milho com enfezamento são menores que as espigas de plantas saudáveis. As plantas com enfezamento podem apresentar também proliferação de espigas pequenas. As espigas pequenas, das plantas doentes, podem apresentar grãos esparsos, grãos pequenos, grãos chochos (Figura 8). A redução no tamanho das espigas e na produção de grãos é variável, dependendo do nível de resistência da cultivar e da idade da planta

infectada, sendo maior quando as plantas são infectadas nos estádios iniciais de desenvolvimento. Redução no comprimento dos internódios e na altura das plantas de milho infectadas é comum.



Figura 8. Espigas de plantas com enfezamento (A) e espigas de plantas sadias (B).

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Diagnóstico, avaliação e dano

Os mollicutes afetam o desenvolvimento, a nutrição e a fisiologia plantas de milho infectadas e, em consequência, a produção de grãos. As plantas infectadas com esses patógenos têm internódios mais curtos, menos raízes, e produzem menos grãos que as plantas sadias (BASCOPÉ-QUINTANILLA, 1977; NAULT, 1980; MASSOLA JÚNIOR et al.,1999; OLIVEIRA et al., 2002c). As plantas de milho infectadas com espiroplasma ou com fitoplasma apresentam menores quantidades absorvidas de nutrientes, e maior conteúdo de água nos tecidos (OLIVEIRA et al., 2002c, 2005). A infecção por espiroplasma reduz a absorção de magnésio pelas plantas de milho

(OLIVEIRA et al., 2002c) e causa alterações ultraestruturais, danificando os cloroplastos dos tecidos foliares (NOME et al., 2009). Mecanismos bioquímicos e moleculares associados ao perfilhamento das plantas de milho infectadas com molicutes têm sido recentemente pesquisados (PECHER et al., 2015).

Assim, a manifestação dos sintomas descritos para as plantas de milho com enfezamentos é aparentemente essencial e diretamente dependente das alterações bioquímicas e fisiológicas causadas pela infecção dos molicutes, como descolorações, em razão dos danos nos cloroplastos, e avermelhamento pela produção de antocianinas (ver [Capítulo 4](#)). A seca precoce das plantas, no estágio de enchimento de grãos (OLIVEIRA et al., 1998, 2002b), é, provavelmente, decorrente do dreno dos fotossintatos para o enchimento dos grãos que a planta consegue produzir, e da rápida perda da água acumulada nos tecidos.

A magnitude desses efeitos e a intensidade dos sintomas dependem do nível de resistência da cultivar de milho e são, aparentemente, proporcionais à multiplicação dos molicutes nos tecidos da planta, sendo mais intensos quando a infecção das plântulas ocorre nos estádios iniciais de desenvolvimento (MASSOLA JÚNIOR et al., 1999).

Para diagnosticar danos causados pelos enfezamentos, em lavouras de milho, é importante observar individualmente e acuradamente cada planta por inteiro, examinando, em primeiro lugar, as folhas superiores, e depois as outras, e também a espiga, os internódios do colmo, a altura da planta, e o aspecto geral do desenvolvimento da planta. A planta com enfezamento causado por molicute pode ser identificada essencialmente pelas descolorações foliares típicas, descritas em outro tópico deste capítulo, associadas

à produção de espiga ou de espigas pequenas, em relação ao tamanho das espigas das plantas saudáveis, frequentemente com grãos que não completaram o enchimento, ou com poucos grãos, e à redução no comprimento dos internódios e na altura, sendo esses sintomas e danos variáveis para diferentes cultivares de milho. A frequência relativa de plantas com sintomas de enfezamentos, na área cultivada, pode ser estimada contando-se em fileira de 10 m de comprimento o número total de plantas e o número de plantas com sintomas, para cálculo da incidência ($\text{Incidência (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de plantas com sintomas}}{\text{número total de plantas na fileira de 10 m de comprimento}} \times 100$). Essa contagem deve ser feita em três fileiras ao acaso, na área, e deve ser calculada a média aritmética da incidência.

A detecção dos mollicutes em amostras de folhas coletadas em plantas com sintomas dos enfezamentos pode ser feita em laboratório, para confirmar o diagnóstico feito em campo. Entretanto, a obtenção de resultado negativo no teste de PCR para detecção desses patógenos é comum, mesmo quando foram inoculados na plântula de milho em condições controladas e a planta adulta apresenta sintomas do enfezamento (OLIVEIRA et al., 1998, 2002d; MASSOLA JÚNIOR et al., 1999). Esses resultados negativos têm sido atribuídos à distribuição não uniforme dos mollicutes nos tecidos da planta, à preservação inadequada das amostras transportadas por longas distâncias, e ao próprio teste. Apesar dessa limitação, o teste permite a detecção dos mollicutes em pelo menos algumas amostras de folhas das plantas de milho com sintomas de enfezamentos, sendo útil como ferramenta auxiliar para confirmar a identificação da doença baseada nos sintomas visuais.

O enfezamento pode reduzir em 70% a produção de grãos da planta doente, em relação à planta sadia, em cultivar de milho susceptível. A redução total na produção de uma área cultivada será sempre diretamente proporcional à incidência de plantas com enfezamento (MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; SABATO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013b).

Em geral, em lavouras com alta incidência de enfezamentos, observa-se grande variação na altura das plantas e no tamanho das espigas.

A avaliação da ocorrência dessas doenças no milho safrinha 2000, no Estado do Paraná, mostrou incidência de plantas com sintomas variando de 6,2% a 49,9%, com média de 20,7% (OLIVEIRA et al., 2002b). Entretanto, não é rara a ocorrência dessas doenças em níveis de incidência superiores a 70% causando danos expressivos em lavouras com mais de 100 ha, como tem sido diversas vezes observado em várias regiões e localidades, a exemplo de Quirinópolis, GO (safrinha 1997), Paraguaçu, SP (safra 2001/2002), do sudoeste de Santa Catarina e do norte do Rio Grande do Sul (safra 2005/2006) (SABATO et al., 2008). Na safra 1994/1995, foi registrado um surto epidêmico dessas doenças, em alta incidência na cultura do milho, atingindo muitas lavouras, na região sudoeste de Goiás e no Triângulo Mineiro (OLIVEIRA et al., 1998), e outro, de mesma proporção, na safrinha 2015, nas regiões de Luís Eduardo Magalhães, BA, no sudoeste de Goiás, no Triângulo Mineiro e noroeste de Minas Gerais.

Ciclo da doença e disseminação de mollicutes na cultura do milho

Quando a cigarrinha *D. maidis* se alimenta de plantas de milho infectadas com mollicutes, adquire esses patógenos, que infectam e se multiplicam nesse inseto-vetor, atingindo as glândulas salivares (ALIVIZATOS; MARKHAN, 1986; OZBEK et al., 2003). Após um período latente, de três a quatro semanas, em que ocorre esse processo de infecção e multiplicação dos mollicutes, variável dependendo da temperatura ambiente, a cigarrinha passa a transmiti-los, cada vez que se alimenta de plântulas de milho saudáveis (NAULT, 1980; MOYA-RAYGOZA; NAULT, 1998).

Os mollicutes são sempre adquiridos em plantas de milho doentes e não são transmitidos às progêneses da cigarrinha *D. maidis* através dos ovos (GONZALES; GÁMEZ, 1974; ALIVIZATOS; MARKHAM, 1986; BASCOPE-QUINTANILLA, 1977). A cigarrinha migra, atingindo longas distâncias, transportando os mollicutes para infectar plântulas de milho em novas lavouras (OLIVEIRA et al., 2002a).

Assim, o ciclo dos enfezamentos causados pelos mollicutes completa-se pelo desenvolvimento da doença nas plantas de milho desde os estádios iniciais de desenvolvimento, com expressão dos sintomas nas plantas em fase de produção (OLIVEIRA et al., 1998, 2002d) e disseminação desses patógenos pelo inseto-vetor, que os adquire nas plantas doentes e infecta plântulas saudáveis de outras lavouras.

A abundância de *D. maidis* durante o ciclo biológico das plantas de milho foi avaliada em três áreas cultivadas com duas cultivares, em quatro datas de semeadura, sendo a distância entre essas áreas

superior a 1.000 m (OLIVEIRA et al., 2015b). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1. Nesse estudo, não foram detectadas diferenças entre as áreas ou entre as cultivares de milho, com relação à incidência das cigarrinhas, e foi verificada diferença significativa entre as épocas de semeadura. As semeaduras realizadas nos meses de fevereiro e de abril, quando foram detectadas maiores quantidades da cigarrinha, correspondem ao período de semeadura do milho safrinha. De forma geral, observou-se aumento na quantidade de cigarrinhas coletadas até a terceira amostragem, e redução nas coletas seguintes.

Tabela 1. Quantidade de cigarrinhas *D. maidis* coletadas durante o ciclo vegetativo do milho, em intervalos de 20 dias desde a semeadura, em quatro diferentes datas de semeadura, em dois anos.

Semeadura	Amostragem								Quantidade
	1	2	3	4	5	6	7	8	
23/2/2012	109	251	370	108	101	58	232	5	1.234a
13/11/2012	25	184	95	95	87	30	0	0	516b
17/4/2013	7	363	255	137	170	122	63	0	1.117a
22/10/2013	23	201	172	103	36	10	0	0	545b
Total	164	998	892	443	394	220	295	5	3.411

Coeficiente de variação (%) = 52,88.

Médias seguidas de letras iguais não são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey, a 5%.

Considerando-se que o período de 20 dias é insuficiente para o desenvolvimento dessa cigarrinha, de ovo a adulto (MARÍN, 1987), e que o milho é seu único hospedeiro (HAAS, 2010), é possível

concluir que os insetos coletados na primeira amostragem são imigrantes, provenientes de outras lavouras de milho. O aumento subsequente na quantidade de insetos pode ser atribuído à população de insetos nascidos na área e também aos insetos imigrantes. A redução na quantidade de insetos a partir da terceira amostragem (60 dias após a semeadura) evidencia sua emigração a partir da fase de florescimento das plantas de milho. O súbito aumento na quantidade de insetos coletados na área 1, ao final do ciclo do milho, foi atribuído à colheita de lavouras de milho vizinhas, que forçou a migração temporária das cigarrinhas para essa área experimental.

Esses resultados permitem deduzir que ocorre efeito de concentração das cigarrinhas nas lavouras de milho semeadas tardiamente, decorrente da migração das cigarrinhas de lavouras anteriores. Podem ser extrapolados para a análise da disseminação das cigarrinhas e dos mollicutes em extensas regiões produtoras de milho, permitindo pensar que, em situações com predominância de muitas lavouras em fase de plântulas, ocorre efeito de diluição das cigarrinhas provenientes de lavouras em fase de produção ou de colheita. Porém, se houver semeadura tardia do milho nesta região, coincidindo com lavouras em fase de produção, ocorrerá concentração das cigarrinhas nessas lavouras tardias.

Tem sido constatada alta incidência de enfezamentos no milho semeado tardiamente na safra de verão e no milho safrinha (OLIVEIRA et al., 1998, 2002b, 2003; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003).

A concentração do inseto-vetor dos mollicutes em uma lavoura com plântulas jovens de milho aumenta a probabilidade de transmissão desses patógenos para as plântulas, porém, é importante lembrar que, para isso, esses insetos precisam estar portando mollicutes. A

probabilidade de as cigarrinhas serem portadoras dos mollicutes aumenta dependendo dos níveis de incidência de plantas com enfezamentos causados por esses agentes, presentes nas lavouras das quais se originam.

Aquisição e transmissão do espiroplasma e do fitoplasma por *D. maidis*, em milho

A cigarrinha *D. maidis* pode transmitir espiroplasma e fitoplasma para o milho, isolada ou simultaneamente (OLIVEIRA et al., 2007, 2015a). Na planta de milho infectada com ambos os patógenos, geralmente, predominam sintomas da infecção por espiroplasma, provavelmente por causa da multiplicação mais rápida desse microrganismo, em relação ao fitoplasma (BASCOPE-QUINTANILLA, 1977; OLIVEIRA et al., 2015a).

Em estudo sobre a transmissão de MBS-fitoplasma, Moya-Raygoza e Nault (1998) verificaram que o período latente desse patógeno na cigarrinha *D. maidis* e o índice de transmissão foram menores em temperaturas de 15 °C e de 30 °C, e maiores em temperaturas de 20 °C e 25 °C. Verificaram também diferenças no índice de transmissão, para três isolados do MBS-fitoplasma, provenientes de diferentes regiões geográficas, em temperatura de 25 °C. A comparação do efeito de diferentes períodos de aquisição de um isolado de MBS-fitoplasma, por *D. maidis*, no índice de transmissão para plântulas de milho, em temperatura ambiente de 22,5 °C, mostrou que o período 72h para aquisição resultou na transmissão desse patógeno por 51% dos insetos testados (LEGRAND; POWER, 1994). Em estudo de transmissão do MBS-fitoplasma, por

D. maidis, verificou-se que apenas insetos que em teste de PCR apresentaram forte banda indicativa da presença desse patógeno o transmitiram para plântulas de milho. Essa transmissão não ocorreu quando as bandas obtidas no teste de PCR eram fracas, sugerindo que a transmissão pode depender da concentração de fitoplasma no inseto. Os índices de transmissão obtidos variaram dependendo da temperatura ambiente, da planta-fonte utilizada, e dos genótipos de milho utilizados para a transmissão (OLIVEIRA, et al., 2011). A transmissão do MBS-fitoplasma pode ser afetada também pela aquisição de espiroplasma por uma mesma cigarrinha *D. maidis* (OLIVEIRA et al., 2007).

A eficiência da aquisição e transmissão do espiroplasma por *D. maidis* é maior em relação ao MBS-fitoplasma. A avaliação de efeito do período de aquisição de espiroplasma por *D. maidis*, no índice de transmissão para plântulas de milho, em temperatura de 29 °C, mostrou transmissão desse patógeno por 81% dos insetos, quando o período de aquisição foi de 72 horas (ALIVIZATOS; MARKHAM, 1986).

O período latente dos mollicutes, nas plantas de milho, e a expressão de sintomas da doença também podem ser afetados pela temperatura (NAULT, 1980; SABATO et al., 2014). Plântulas de milho infectadas com espiroplasma e com fitoplasma e cultivadas em câmaras de crescimento com temperaturas entre 15 °C e 30 °C ou 23 °C e 34 °C apresentaram primeiro os sintomas correspondentes ao enfezamento-vermelho e, em seguida, sintomas do enfezamento-pálido. Em câmaras com temperaturas entre 12 °C e 23 °C e entre 13 °C e 25 °C, plântulas infectadas com ambos os patógenos apresentaram unicamente os sintomas do enfezamento-vermelho (BASCOPE-QUINTANILLA, 1977).

Cigarrinhas *D. maidis* coletadas em campo, e individualmente confinadas em plântulas de milho sadias, permitiram a obtenção de plantas simultaneamente infectadas por espiroplasma e por fitoplasma. Resultados do estudo da transmissão simultânea desses patógenos, a partir dessas plantas, mostraram variabilidade entre os isolados e combinações de fitoplasma e espiroplasma, com relação à eficiência de transmissão e ao desenvolvimento de sintomas nas plantas infectadas (OLIVEIRA et al., 2015a).

Manejo dos enfezamentos causados por molicutes na cultura do milho

Vários fatores influenciam a incidência dos enfezamentos, como a densidade populacional de cigarrinhas *D. maidis* infectantes com molicutes, o nível de resistência da cultivar de milho, e a temperatura ambiente. A variação nas datas de semeadura proporciona coincidência entre plantas em fase de produção e em estádios iniciais de desenvolvimento, permitindo a migração das cigarrinhas, a ocorrência de vários ciclos dessas doenças, e a concentração das cigarrinhas e dos molicutes nas lavouras mais tardias, incluindo a safrinha. Esses efeitos podem ser acentuados nas regiões quentes e em localidades em que se cultiva milho irrigado, com obtenção de mais de uma safra ao ano.

As medidas a serem adotadas para evitar, ou pelo menos minimizar, danos por enfezamentos na produção de lavouras de milho requerem a análise do risco de incidência dessas doenças em níveis altos e da possibilidade de se evitar práticas que as favoreçam.

Uma alternativa para escapar dessas doenças, ao menos em regiões onde o inverno é frio, com temperaturas baixas, inadequadas para o desenvolvimento da cigarrinha e dos mollicutes, é evitar a semeadura tardia do milho. Como discutido no tópico referente ao ciclo da doença, as lavouras semeadas tardiamente, incluindo as semeaduras da safrinha, estão mais expostas à alta incidência do inseto-vetor dos mollicutes e, em consequência, da alta incidência desses patógenos, particularmente quando as cigarrinhas que migram para essas lavouras tardias provêm de lavouras com alta incidência de enfezamentos.

A utilização de cultivares de milho com resistência genética aos enfezamentos pode minimizar danos por essas doenças. É recomendável diversificar as cultivares para evitar possível seleção de variantes desses patógenos e causar quebra da resistência.

O tratamento das sementes de milho com inseticidas específicos, registrados no Ministério da Agricultura para controle da cigarrinha *D. maidis*, pode contribuir para reduzir a população desse inseto-vetor nos primeiros trinta dias de desenvolvimento da lavoura e, em alguns casos, reduzir o nível de incidência dessas doenças (ver [Capítulo 7](#)). Entretanto, considerando-se que essa cigarrinha necessita alimentar-se da plântula de milho para ser morta pelo efeito do inseticida sistêmico, ela pode transmitir os mollicutes para a plântula antes de morrer. Além disso, em situações em que nesta lavoura jovem ocorre entrada contínua de cigarrinhas infectantes com mollicutes, provenientes de lavouras adultas próximas, a eficácia do tratamento das sementes com inseticidas para controlar as cigarrinhas e, em consequência, controlar os enfezamentos pode ser baixa.

Assim, para se obter maior eficiência no controle dessas doenças, em áreas e períodos de maior risco, é recomendável utilizar simultaneamente todas essas medidas: semear mais de uma cultivar de milho, tratar as sementes com inseticidas para controlar a cigarrinha, sincronizar a semeadura com o período de semeadura adotado para a maioria das lavouras na região. Além disso, deve-se evitar deixar na área plantas de milho voluntárias (“tiguera”), que preservam os mollicutes e as cigarrinhas para cultivo de milho subsequente.

Referências

ALIVIZATOS, A. S.; MARKHAM, P. G. Acquisition and transmission of corn stunt Spiroplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals of Applied Biology**, v. 108, p. 535-544, 1986.

BARNES, D. **Biología, ecología, y distribución de las chicharritas, *Dalbulus elimatus* (Ball) y *Dalbulus maidis* Del. & W.** México, DF: Secretaria de Agricultura y Ganadería, Oficina de Estudios Especiales, 1954. 112 p. (Folleto técnico, 11).

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

BASCOPE-QUINTANILLA, J. B. **Agente causal de la llamada “raza mesa central” del achaparramiento del maíz.** 1977. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Escuela Nacional de Agricultura, Colegio de Postgraduados, Chapingo.

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

CARLONI, E.; VIRLA, E. G.; PARADELL, S.; CARPANE, P.; NOME, C.; LAGUNA, I.; GIMÉNEZ-PECCI, M. P. *Exitianus obscurinervis* (Hemiptera: Cicadellidae), a new experimental vector of *Spiroplasma kunkelii*. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 6, p. 1793-1799, 2011.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma no milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, n. 4, p. 39-41, 1971.

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

GONZALES, V.; GÁMEZ, R. Algunos factores que afectan la transmisión del virus del rayado fino del maíz por *Dalbulus maidis* DeLong & Wolcott. **Turrialba**, v. 24, n. 1, p. 51-57, 1974.

GORDON, D. T.; BRADFUTE, O. E.; GINGERY, R. E.; KNOKE, J. K.; LOUIE, R.; NAULT, L. R.; SCOTT, G. E. Introduction: history, geographical distribution, pathogen characteristics, and economic importance. In: GORDON, D. T.; KNOKE, J. K.; SCOTT, G. E. **Virus and viruslike diseases of maize in the United States**. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1981. p. 1-12.

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

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

KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Microscopia eletrônica de microrganismos tipo micoplasma nos tecidos de milho afetado pelo enfezamento e nos órgãos da cigarrinha vectora portadora. **Bragantia**, v. 31, n. 6, p. 75-87, 1972.

LEGRAND, A. I.; POWER, A. G. Inoculation and acquisition of maize bushy stunt mycoplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals of Applied Biology**, v.125, p.115-122, 1994.

MARÍN, R. Biología y comportamiento de *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae). **Revista Peruana de Entomología**, v. 30, n. 113-117, 1987.

MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I.; AMORIM, L.; LOPES, J. R. S. Quantificação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 136-142, 1999.

MOYA-RAYGOZA, G.; NAULT, L. R. Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn-leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). **Arthropods in Relation to Plant Disease**, v. 91, n. 5, p. 668-676, 1998.

NAULT, L. R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica**, v. 35, p. 165-175, 1990.

NAULT, L. R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, v. 70, n. 7, p. 659-662, 1980.

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

NOME, C.; MAGALHÃES, P. C.; NOME, S.; LAGUNA, G. Differences in intracellular localization of corn stunt spiroplasmas in magnesium treated maize. **Biocell**, v. 33, n. 2, p. 133-136, 2009.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R.; NAULT, L. R. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 147, p. 2, p. 141-153, 2013a.

OLIVEIRA, C. M.; MOLINA, R. M. S.; ALBRES, R.; LOPES, J. R. Disseminação de mollicutes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 91-95, 2002a.

OLIVEIRA, E. de; CARVALHO, R. V. de; DUARTE, A. P.; ANDRADE, R. A.; RESENDE, R. de O.; OLIVEIRA, C. M. de; RECO, P. C. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 2, p. 38-46, 2002b.

OLIVEIRA, E. de; GAMA, E. E. G. e; TEIXEIRA, F. F.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, A. R. Genetic control of maize resistance to corn stunt spiroplasma. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 3, n. 2, p. 68-71, 2013b.

OLIVEIRA, E. de; LANDAU, E. C.; SOUSA, S. M. de. Simultaneous transmission of phytoplasma and spiroplasma by *Dalbulus maidis* leafhopper and symptoms of infected maize. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, S99-S100, 2015a.

OLIVEIRA, E. de; MAGALHÃES, P. C.; GOMIDE, R. L.; VASCONCELOS, C. A.; SOUZA, I. R. P.; CRUZ, I.; SHAFERT, R. Growth and nutrition of mollicute infected maize. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 945-949, 2002c.

OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, A. C. de. Incidência de enfezamento e de maize rayado Fino Virus em milho em diferentes épocas de plantio e relação entre a expressão de sintomas dos Enfezamentos e produção. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 3, p. 221-224, 2003.

OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, C. M. de; MAGALHÃES, P. C.; ANDRADE, C. de L. T.; HOGENHOUT, S. A. Spiroplasma and phytoplasma infection reduce kernel production, and nutrient and water contents of several but not all maize cultivars. **Maydica**, v. 50, p. 171-178, 2005.

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

OLIVEIRA, E. de; RESENDE, R. de O.; GIMÉNEZ-PECCI, M. de la P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativas de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 19-25, 2003.

OLIVEIRA, E. de; SANTOS, J. C.; MAGALHÃES, P. C.; CRUZ, I. Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affect by spiroplasma acquisition and environmental conditions. **Bulletin of Insectology**, v. 60, n. 2, p. 229-230, 2007.

OLIVEIRA, E. de; SOUSA, S. M. de; LANDAU, E. C. Transmission of maize bushy stunt phytoplasma by *Dalbulus maidis* leafhopper. **Bulletin of Insectology**, v. 64, p. 153-154, 2011.

OLIVEIRA, E. de; TERNES, S.; VILAMIU, R.; LANDAU, E. C.; OLIVEIRA, C. M. de. Abundance of the insect vector of two different mollicutes plant pathogens in the vegetative maize cycle. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, S117-S118, 2015b.

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, W. E. Enfezamento pálido e enfezamento vermelho na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 45-47, 1998.

OZBEK, E.; MILLER, S. A.; MEULIA, T.; HOGENHOUT, S. A. Infection and replication of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, p. 167-175, 2003.

PECHER, P.; SUGIO, A.; CANALE, M. C.; ORLOVSKIS, Z.; MACLEAN, A.; LOPES, J. R. S.; HOGENHOUT, S. A. TB1 and other TCP transcription factors are targets for phytoplasma effector protein SAP11. In: ANNUAL MAIZE GENETICS CONFERENCE, 57., 2015, St. Charles, Illinois. **Program and abstract...** [S.l. : s.n.], 2015. p.161.

SABATO, E.; SOUZA, I. R. P.; ALVES, E.; OLIVEIRA, C. M. Incidência do inseto-vetor de mollicutes e de enfezamentos em milho. **Summa Phytopathologica**, n. 34, S. 95, resumo 296, fev. 2008. Edição do XXXI Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas, 2008. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69974/1/Incidencia-inseto.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

SABATO, E. O.; GALVÃO, S. R.; LANDAU, E. C. Efeitos da temperatura no enfezamento pálido do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 30.; SIMPÓSIO SOBRE LEPDOPTEROS COMUNS A MILHO, SOJA, E ALGODÃO, 1., 2014, Salvador. **Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global**: resumos expandidos. Sete lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2014.1 CD-ROM.

SABATO, E. O.; LANDAU, E. C.; COELHO, A. M. Effect of the corn stunt spiroplasma disease on maize production. **Acta Phytopathologica Sinica**, v. 43, p. 203-204, 2013. Suplemento. Edição dos Abstracts do 10º International Congress of Plant Pathology, Beijing, 2013.

WHITCOMB, R. F.; CHEN, T. A.; WILLIAMSON, D. L.; LIAO, C.; TRULLY, J. G.; BOVÉ, J. M.; MOUCHES, C.; ROSE, D. L.; COAN, M. E.; CLARK, T. B. *Spiroplasma kunkelii* sp. Nov.: characterization of the etiological agent of corn stunt disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 170-178, 1986.

Capítulo 2

Detecção molecular de mollicutes em milho

Sylvia Morais de Sousa | Beatriz de Almeida Barros



O enfezamento-vermelho (*maize bushy stunt* – MBS) e o enfezamento-pálido (*corn stunt* – CS) são duas importantes doenças que têm ocorrência registrada em plantas de milho (*Zea mays* L.) nas Américas do Sul, Central e do Norte (BEDENDO et al., 2000; LEE et al., 2000; GOMES et al., 2004). Dois diferentes microrganismos da classe Mollicutes, colonizadores do floema, são os responsáveis por essas doenças. Um fitoplasma não cultivável em meio de cultura é o provável agente do enfezamento-vermelho, enquanto o causador do enfezamento-pálido é o *Spiroplasma kunkelii*, um microrganismo caracterizado pela forma helicoidal,

motilidade e crescimento em meio de cultura. Apesar das diferenças entre os sintomas dessas duas doenças de ocorrência ampla, o diagnóstico de MBS e CS pode ser confundido com uma mistura de infecções e com vírus, e, além disso, os sintomas sofrem influência das variações de temperatura e das plantas hospedeiras (NAULT, 1980). Por isso, a detecção molecular do agente patogênico é de fundamental importância para a correta identificação da doença.

A disponibilidade de técnicas acuradas de detecção desses mollicutes facilita os estudos de filogenia, ecologia do patógeno e permite os estudos de incidência e disseminação dessas doenças no milho (BARROS et al., 2001; GASPARICH, 2010; OLIVEIRA et al., 2011, 2015; DE SOUSA et al., 2015).

Espiroplasma

Inicialmente, a detecção de espiroplasma era feita por meio da microscopia ótica e eletrônica de transmissão (DAVIS et al., 1972; OZBEK et al., 2003). A microscopia eletrônica envolve não apenas equipamentos caros, mas também a preparação das amostras é demorada e complexa e, portanto, difícil de ser utilizada como rotina (WEI et al., 2006). A introdução de métodos imunológicos utilizando anticorpos mono e policlonais facilitou a detecção do mollicute (GORDON et al., 1985; CHEN; JIANG, 1988; HSU et al., 1990). O ensaio ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) baseia-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas (teste imunoenzimático) e foi utilizado para detecção do espiroplasma em *D. maidis* coletado em campo. Esta detecção foi realizada pela primeira vez em 1981–1982 em

cigarrinhas do milho, no México (NAULT et al., 1983). Esse método ainda tem sido usado, porém requer anticorpos de alta qualidade e material de consumo com qualidade e eficiência consistentes (WEI et al., 2006). Posteriormente, a hibridação de DNA utilizando fragmentos randômicos de DNA como sondas também se mostrou um método sensível e específico para a detecção de DNA (KISON et al., 1994), porém, é muito laborioso e envolve o uso de material radioativo.

Foi com a popularização da reação em cadeia da polimerase (PCR) que a detecção dos mollicutes ficou mais acessível. O PCR tem algumas vantagens em relação às demais técnicas, como maior sensibilidade e especificidade, além de menor custo. Duas proteínas específicas de espiroplasma, espiralina e fibrilina têm sido utilizadas para se desenhar primers específicos (FOISSAC et al., 1997; GASPARICH, 2010). Barros et al. (2001) desenharam primers para o gene espiralina, principal proteína de membrana do espiroplasma, e conseguiram identificar isolados de *S. kunkelli*. O gene da espiralina possui regiões variáveis e conservadas que possibilitam o desenho de primers para detecção e identificação de outras espécies de espiroplasmas do grupo I. Esses primers amplificam DNA de *S. kunkelli*, gerando fragmentos de aproximadamente 500 pares de base, sem amplificar DNA de outras espécies do gênero *Spiroplasma*, que já foram testadas. Esses primers foram utilizados para estudar a variabilidade genética de isolados de espiroplasma de plantas de milho coletadas em diferentes regiões do Brasil, porém, como a região utilizada é conservada, foi detectada a presença desse mollicute, mas não foi observada diversidade genética (GOMES et al., 2004). Carpane et al. (2013) utilizaram diversos primers para amplificar diferentes regiões do genoma do *S.*

kunkelii e analisaram diferentes isolados de diversas áreas e encontraram um baixo grau de polimorfismo.

Alguns kits foram desenvolvidos pela indústria, inicialmente para detectar contaminação de micoplasma em cultura de células, mas eles também conseguem detectar espiroplasma. Esses kits são baseados em PCR, e alguns exemplos que estão no mercado são: LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), MycoSolutions Detection Kit (AppliChem, LLC, Boca Raton, FL), EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Life Technologies, Delhi, India) and MicroSEQ Mycoplasma Detection Assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) (GASPARICH, 2010).

Com a popularização do PCR em tempo real, que detecta o crescimento exponencial da fluorescência através do uso de primers e sondas específicas, a detecção dos mollicutes ficou ainda mais rápida, sensível e específica. Foi desenvolvido um ensaio para detecção de *S. kunkelii* com base no gene da adesina, com sensibilidade 100 vezes maior do que o ensaio de PCR convencional e, além disso, não houve amplificação de patógenos, como o *S. citri* (WEI et al., 2006). Este novo gene de adesina foi identificado através da anotação do genoma da *S. kunkelii* da estirpe CR2-3x (WEI et al., 2006) e outros genes poderão ser identificados e utilizados em estudos de identificação e classificação.

Fitoplasma

Os métodos de detecção mais antigos eram baseados nos sintomas e na observação de cortes ultrafinos de plantas infectadas (HAGGIS; SINHA, 1978), porém, com o desenvolvimento da biologia molecular, a detecção por PCR ficou mais fácil e rápida. Os primers para detecção de fitoplasma se baseiam no gene 16S rDNA, região intergênica espaçadora 16S-23S, gene *rp* e fator de alongação EF-Tu (LEE et al., 1991; LIM; SEARS, 1991; AHRENS; SEEMULLER, 1992; DAIRE et al., 1992; DAVIS; LEE, 1993; DAVIS et al., 1993; FIRRAO et al., 1993; MURRAY; SCHLEIFER, 1994; LORENZ et al., 1995; GUNDERSEN; LEE, 1996; SMART et al., 1996; BARROS et al., 2001; GASPARICH, 2010).

O gene 16S rDNA foi utilizado pela primeira vez por Deng e Hiruki (1991) para detectar doenças relacionadas ao fitoplasma, gerando um produto de PCR de 1.200 pares de base. Primers específicos, com base na sequência bem caracterizada de 16S rDNA de fitoplasmas de plantas, possibilitaram a amplificação em hospedeiros com baixa concentração desse molécula. Um primer universal foi desenhado para amplificação e identificação de fitoplasmas que infectam plantas, e uma análise de RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) do produto amplificado de 16S rDNA foi utilizada para diferenciar e classificar os fitoplasmas (LEE et al., 1993). Essa técnica permitiu a identificação e a classificação de um grande número de estirpes de fitoplasmas da América do Norte, Ásia e Europa em 15 grupos (LEE et al., 1993). Os primers R16F2 e R16R2 descritos por Lee et al. (1993) são específicos para detectar fitoplasma. Esse par de primer universal amplificou um fragmento de 1.200 pb (pares de base) referente ao gene 16S rDNA de plantas infectadas com fitoplasma e não amplificou plantas saudáveis. Este mesmo par de primer também foi utilizado para verificar a variabilidade e para caracterizar

regiões do cromossomo de 35 linhagens de fitoplasma do grupo 16SrI-B Aster Yellows (BOTTI; BERTACCINI, 2003). Neste estudo também foram utilizados os primers rpF2/rpR2 (GUNDERSEN et al., 1994) para amplificar a proteína ribossomal rpL22 e fTufu/rTufu (SCHNEIDER et al., 1997) para amplificar a porção maior do gene *tuf* que codifica o fator de alongação Ef-Tu. Para os estudos de variabilidade, os produtos de PCR foram analisados por RFLP com diferentes enzimas de restrição (MseI, AluI e Tsp509I), permitindo assim a visualização de diferentes tamanhos de fragmentos e, conseqüentemente, a diferenciação das estirpes (BOTTI; BERTACCINI, 2003).

Os primers baseados em 16S rDNA são úteis para a detecção de fitoplasma nas plantas e em insetos-vetores, porém, em alguns casos, a sequência é muito similar, dificultando o desenho de primers que visem a identificação de um tipo específico de fitoplasma (SMART et al., 1996). Até o momento, todos os fitoplasmas examinados contêm dois operons rDNA, que parecem ser idênticos (SCHNEIDER; SEEMULLER, 1994). Smart et al. (1996) estudaram a região espaçadora localizada entre os genes 16S e 23S rDNA e como há menos gargalos evolutivos nessa região do operon ela normalmente tem maior variação que a do gene 16S (BARRY et al., 1991). Essa região já foi usada para detectar micoplasma em cultura de células (HARASAWA et al., 1993) e para identificar subespécies de *Clavibacter michiganensis* (LI; DE BOER, 1995). Além disso, o sequenciamento da região espaçadora permitiu a localização de sequências conservadas e variáveis. A partir desses estudos foram desenhados primers para diversos grupos de fitoplasma, incluindo o grupo do milho (SMART et al., 1996). O par de primer P1/Tint se mostrou eficiente para a detecção de todos os grupos de fitoplasma testados e não amplificou o *Spiroplasma citri* e

nem o *S. kunkelii*. Após a amplificação com P1/Tint, que amplifica um fragmento de 1.600 pb, é possível utilizar outro par de primers para determinar o grupo ao qual o fitoplasma pertence. O par de primers P1/AYint conseguiu diferenciar membros do grupo Aster Yellows, sendo possível detectar SAY (Severe Aster Yellows), cuja planta hospedeira é a *C. roseus* e o MBS do milho, uma vez que as sequências são praticamente idênticas (KIRKPATRICK et al., 1994; SCHNEIDER et al., 1995).

As ferramentas mais recentes de detecção molecular são microarranjos baseados no gene 16S rDNA e podem identificar a presença de todos os fitoplasmas já caracterizados (NICOLAISEN; BERTACCINI, 2007). Além disso, o PCR em tempo real tem sido utilizado para a detecção e quantificação de fitoplasmas (CHRISTENSEN et al., 2004; TORRES et al., 2005; HREN et al., 2007; WEI et al., 2004).

Metodologia para detecção de fitoplasma e espiroplasma por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Apesar de metodologias mais recentes estarem ficando mais populares, como PCR em tempo real, o PCR convencional ainda é a técnica mais utilizada e validada para detecção de fitoplasma e de espiroplasma em milho. O primeiro passo para realizar as análises de PCR é a coleta de amostras, seguida da extração de DNA, amplificação, visualização em gel de agarose e análise dos resultados.

Coleta das amostras

A coleta de amostras depende do objetivo do estudo, e podem ser coletados tanto insetos-vetores quanto tecidos das plantas. Os insetos-vetores podem ser preservados em álcool 70%, congelados, ou liofilizados. Os tecidos vegetais podem ser preservados por congelamento ou liofilização. Essas amostras biológicas podem também ser processadas para extração do DNA imediatamente após a coleta. Havendo necessidade de transporte das amostras a longas distâncias, deve-se evitar sua deterioração, recorrendo-se, preferivelmente, à preservação em geladeira ou em caixa térmica com gelo. Amostras de folhas das plantas podem ser coletadas, lavadas com sabão ou detergente, secas com papel toalha e colocadas em sacos plásticos para transporte rápido via correio. Observa-se que folhas de papel não devem ser colocadas junto com a amostra em saco plástico, para evitar a formação de câmara úmida e deterioração por fungos e bactérias saprófitas.

Extração de DNA

A extração de DNA, tanto de cigarrinhas como de plantas, é feita de acordo com Saghai-Maroo et al. (1984), com modificações, e os detalhes estão descritos nos Protocolos 1 e 2. A quantificação e a verificação da qualidade dos DNAs são feitas por espectrofotometria e em gel de agarose 0,8%, respectivamente.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) - amplificação, visualização e análise dos resultados

Após a extração de DNA, é realizado o PCR que, caso seja utilizado para a detecção de mollicutes, pode ser um multiplex, com primers para detecção simultânea do fitoplasma e do espiroplasma – CSSR6/CSSF2 e R16R2/R16R2 (Tabela 1). Além dos primers CSSR6/CSSF2 e R16R2/R16R2 já descritos, pode ser utilizada a combinação P1/AYint/Tint (SMART et al., 1996) para a detecção de fitoplasma (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados para detecção molecular de mollicutes em milho.

Primer	Espécie	Sequência	Referência
R16F2	Fitoplasma	acgactgctgctaagactgg	Lee et al. (1993)
R16R2		tgacgggcggtgtgtacaaaccccg	
CSSF2	Espiroplasma	ggcaaagatgtaacaaaaagt	Barros et al. (2001)
CSSR6		gttacttcaacagtagttgcg	
P1	Fitoplasma	aagagtttgatcctggctcaggatt	Smart et al. (1996)
AYint		tacaatttgaagcaaggttac	
Tint		tcaggcgtgtgcttaaccagc	
dalCOIfwd	<i>D. maidis</i>	tgactcaacctgggtcgttt-	Palomera et al. (2012)
dalCOIrev		tggtataggattgggtcacca	
ACTF	<i>Z. mays</i>	tgatgaagattctcactgag	Lana (2007)
ACTR		gatccacatctgttgaacg	

É importante colocar sempre um controle positivo (amostra infectada), um controle negativo (amostra de planta ou de cigarrinha sadia) e um controle para a reação (sem DNA). Além disso, é essencial o uso de controles internos, para verificar a qualidade do DNA e descartar falsos negativos. Um exemplo de controle para

cigarrinha é o gene citocromo oxidase (PALOMERA et al., 2012) e para planta, o da actina (LANA, 2007) (Tabela 1).

Os fragmentos das reações de PCR são resolvidos em gel de agarose 1,0% corado com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA), visualizados sob luz ultravioleta e digitalizados em um sistema processador de imagens. As condições de cada reação estão descritas no Protocolo 3.

Um exemplo de resultados esperado para os experimentos de PCR encontra-se na Figura 1 (DE SOUSA et al., 2015). A Figura 1A mostra a presença de fitoplasma e de espiroplasma tanto na cigarrinha quanto na planta. O gene da citocromo oxidase (mtCOI) foi usado como controle para o DNA da cigarrinha, o que permitiu constatar que o resultado negativo foi real e não devido à baixa qualidade do DNA (Figura 1B). Além disso, foi utilizado um gene controle, actina, para testar a qualidade do DNA em todas as plantas que apresentaram sintomas (Figura 1C) (DE SOUSA et al., 2015).

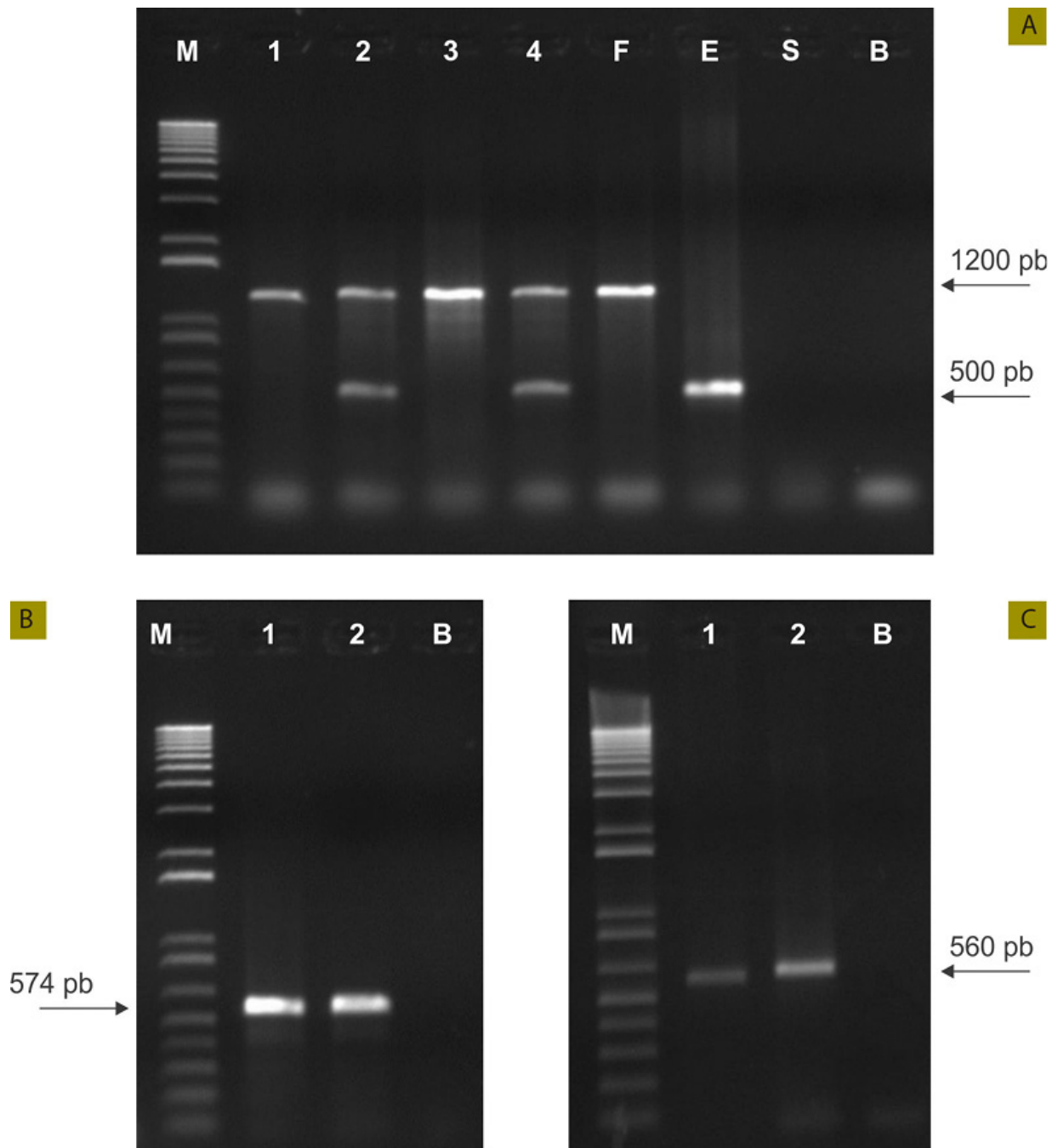


Figura 1. Reações de PCR para detecção de fitoplasma e de espiroplasma em cigarrinhas (amostras 1 e 2) e em plantas sintomáticas de milho (3 e 4) (A). Para controles de reação foram utilizados os controles internos: citocromo oxidase para cigarrinhas (B) e actina (C) para milho. F e E = controles positivos para fitoplasma e espiroplasma, respectivamente. S = cigarrinha sadia. B = branco. M = 1 kb Plus Ladder (Invitrogen). As setas pretas indicam o tamanho do inserto amplificado.

Fonte: De Sousa et al. (2015).

Protocolo 1

Protocolo de extração de DNA de cigarrinhas (SAGHAI-MARROF et al. 1984, com modificações)

1. Calcular a quantidade de tampão CTAB a ser utilizada – 100 μL x nº de amostras. Ao volume final, adicionar 2% (v/v) de β -mercaptoethanol. Esse procedimento deve ser realizado em capela de exaustão.
2. Adicionar 100 μL da solução tampão em um microtubo de 1,5 mL (tipo eppendorf). Colocar 1 cigarrinha no tubo e macerar com auxílio de um pistilo de plástico.
3. Incubar a 65 °C por 1 hora, homogeneizando gentilmente a cada 15 minutos.
4. Resfriar os tubos em temperatura ambiente por 1 minuto.
5. Adicionar 100 μL de clorofórmio:octanol (24:1 – v/v) em cada tubo e homogeneizar por 10 minutos em agitador por inversão.
6. Centrifugar os tubos a 10.000 rpm por 10 minutos.
7. Retirar o sobrenadante e transferir para um novo microtubo devidamente identificado.
8. Adicionar ao sobrenadante 100 μL de isopropanol gelado (-20 °C), homogeneizar e incubar a -20 °C por 2 horas.
9. Centrifugar os tubos a 14.000 rpm por 10 minutos. Descartar o sobrenadante.
10. Adicionar 100 μL de etanol 70% (v/v) e centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos.
11. Descartar o sobrenadante e deixar o precipitado em temperatura ambiente até completa evaporação da solução de etanol ou

utilizar centrífuga a vácuo para secagem rápida.

2. Ressuspender o precipitado em 20 μ L de TE (pH 8,0) contendo RNase A (na concentração final de 40 μ g/mL). Armazenar as amostras a -20 °C.

Soluções estoques (concentrações finais)

Tampão CTAB: CTAB 2% (p/v)

Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)

NaCl 1,4 M

EDTA 0,05 M (pH 8,0)

TE: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)

EDTA 1 mM (pH 8,0)

Protocolo 2

Protocolo de extração de DNA de milho (SAGHAI-MARROF et al. 1984, com modificações)

1. Macerar 200 mg do tecido foliar em almofariz, com auxílio de nitrogênio líquido.
2. Identificar o microtubo, mergulhar sua borda no nitrogênio líquido e recolher o material pulverizado (usualmente até a metade do microtubo).
3. Utilizando a capela de exaustão, adicionar 350 μ L de tampão de CTAB contendo 2% (v/v) de β -mercaptoetanol.

4. Incubar a amostras em banho-maria a 65 °C por 1 hora e homogeneizar a cada 15 minutos.
5. Dentro da capela de exaustão, resfriar por 5 minutos.
6. Adicionar 350 µL de solução de clorofórmio--octanol (24:1 – v/v) e homogeneizar por 25 minutos em agitador por inversão.
7. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos.
8. Retirar o sobrenadante e transferir para microtubo novo devidamente identificado.
9. Adicionar 300 µL de isopropanol gelado (-20 °C) no microtubo contendo a fase aquosa (sobrenadante). Misturar por inversão e incubar a -20 °C por 2 horas.
- .0. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante.
- .1. Ao precipitado, adicionar 140 µL etanol 70% gelado (4 °C). Homogeneizar manualmente o microtubo.
- .2. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante.
- .3. Deixar o precipitado em temperatura ambiente até completa evaporação da solução de etanol ou utilizar centrífuga a vácuo para secagem rápida.
- .4. Ressuspender o precipitado em 50 µL de TE (pH 8,0) contendo RNase A (na concentração final de 40 µg/mL). Armazenar as amostras a -20 °C.

Protocolo 3

Reações de PCR

Multiplex para detecção de fitoplasma e espiroplasma

Reagente	Concentração final	Condição de ciclagem
DNA	50 ng	
MgCl ₂	1,5 mM	
Tampão para PCR	1X	94 °C/2min
dTNPs	0,2 mM	94 °C/30 seg
CSSR6	0,1 µM	52 °C/30 seg 35 ciclos
CSSF2	0,1 µM	72 °C/1,5 min
R16R2	0,5 µM	72 °C/10 min
R16F2	0,5 µM	4 °C/∞
Taq DNA Polimerase	1 U	
H ₂ O	qsp completar o volume final	

Reação para os controles internos

As mesmas condições são utilizadas para as reações dos controles internos para plantas e cigarrinhas

Reagente	Concentração final	Condição de ciclagem
DNA	50 ng	
MgCl ₂	1,5 mM	94 °C/2min
Tampão para PCR	1X	94 °C/20 seg
dTNPs	0,2 mM	58 °C/20 seg 35 ciclos
Primer F ⁽¹⁾	0,5 µM	72 °C/30 seg
Primer R ⁽²⁾	0,5 µM	72 °C/5 min
Taq DNA Polimerase	1 U	4 °C/∞

⁽¹⁾ dalCOIfwd para cigarrinhas ou ACTF para plantas (ver Tabela 1).

⁽²⁾ dalCOIfrev para cigarrinhas ou ACTR para plantas (ver Tabela 1).

Eletroforese

Os fragmentos das reações de PCR são resolvidos em gel de agarose 1,0% corado com GelRed™, visualizados sob luz ultravioleta e digitalizados em um sistema processador de imagens. A utilização do GelRed™ é muito vantajosa por se tratar de um reagente mais seguro, e pode ser feita diretamente no gel ou em solução para coloração pós-corrída. No caso do uso direto no gel, a migração do DNA pode ser afetada dependendo da relação corante: quantidade de DNA. De acordo com o fabricante, se isto ocorrer, deve-se reduzir pela metade ou para 1/3 a quantidade da reação de PCR a ser carregada no gel ou reduzir a quantidade de corante utilizada (exemplo 0,5X). Quando possível, deve-se optar pela coloração pós-corrída, feita com uma solução de GelRed 3X, que evita qualquer interferência na migração do DNA durante a eletroforese. Informações sobre o produto encontram-se no site Biotium (2016).

Referências

AHRENS, U.; SEEMULLER, E. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rDNA gene. **Phytopathology**, v. 82, p. 828-832, 1992.

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

BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; DUNICAN, L. K.; GANNON, F. The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. **PCR Methods and Applications**, v. 1, p. 51-56, 1991.

BEDENDO, I. P.; DAVIS, R. E.; RESENDE, R. O.; DALLY, E. L. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. **International Journal of Pest Management**, v. 46, p. 73-76, 2000.

BIOTIUM. Glowing Products for Science. **Product information:** GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in Water. Disponível em: <<http://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/PI-41003.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2016.

BOTTI, S.; BERTACCINI, A. Variability and functional role of chromosomal sequences in 16Srl-B subgroup phytoplasmas including aster yellows and related strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 103-110, 2003.

CARPANE, P.; MELCHER, U.; WAYADANDE, A.; PECCI, M. P. G.; LAGUNA, G.; DOLEZAL, W.; FLETCHER, J. An analysis of the genomic variability of the phytopathogenic mollicute *Spiroplasma kunkelii*. **Phytopathology**, v. 103, p. 123-134, 2013.

CHRISTENSEN, N. M.; NICOLAISEN, M.; HANSEN, M.; SCHULZ, A. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 1175-1184, 2004.

DAIRE, X.; BOUDON-PADIEU, E.; BERVILLE, A.; SCHNEIDER, B.; CAUDWELL, A. Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). **Annals of Applied Biology**, v. 121, p. 95-103, 1992.

DAVIS, R. E.; DALLY, E. L.; BERTACCINI, A.; LEE, I. M.; CREDI, R. C.; BARBA, M. Restriction fragment length polymorphism analyses and dot hybridization distinguish mycoplasma-like organisms associated with flavescence dorée and southern European grapevine yellows disease in Italy. **Phytopathology**, v. 83, p. 772-776, 1993.

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

DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F.; WHITCOMB, R. F.; ISHIJIMA, T.; STEERE, R. L. Helical filaments produced by a mycoplasma-like organism associated with corn stunt disease. **Science**, v. 176, p. 521-523, 1972.

DE SOUSA, S. M.; OLIVEIRA, E. de; BARROS, B. de A.; ABREU, M. G. de; HIPÓLITO, L. P. T. **Infectividade da cigarrinha *Daubulus maidis* com fitoplasma e espiroplasma em milho em diferentes épocas do ano**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 120).

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

- FIRRAO, G.; GOBBI, E.; LOCCI, R. Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, v. 83, p. 602-607, 1993.
- FOISSAC, X.; BOVE, J. M.; SAILLARD, C. Sequence analysis of *Spiroplasma phoeniceum* and *Spiroplasma kunkelii* spiralin genes and comparison with other spiralin genes. **Current Microbiology**, v. 35, p. 240-243, 1997.
- GASPARICH, G. E. Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. **Biologicals**, v. 38, p. 193-203, 2010.
- GOMES, E. A.; JARDIM, S. N.; GUIMARÃES, C. T.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, E. Genetic variability of Brazilian phytoplasma and spiroplasma isolated from maize plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 61-65, 2004.
- GORDON, D. T.; NAULT, L. R.; GORDON, N. H.; HEADY, S. E. Serological detection of corn stunt spiroplasma and maize rayado fine virys in field-collected *Dalbulus* spp. from Mexico. **Plant Disease**, v. 69, p. 108-111, 1985.
- GUNDERSEN, D. E.; LEE, I.-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 35, p. 114-151, 1996.
- GUNDERSEN, D. E.; LEE, I.-M.; REHNER, S. A.; DAVIS, R. E.; KINGSBURRY, D. T. Phylogeny of Mycoplasma-like organisms (Phytoplasmas): a basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 5244-5254, 1994.
- HAGGIS, G. H.; SINHA, R. C. Scanning electron microscopy of mycoplasma-like organisms after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. **Phytopathology**, v. 68 p. 677-680, 1978.
- HARASAWA, R.; MIZUSAWA, H.; NOZAWA, K.; NAKAGAWA, T.; ASADA, K.; KATO, I. Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. **Research in Microbiology**, v. 144, p. 489-493, 1993.
- HREN, M.; BOBEN, J.; ROTTER, A.; KRALJ, 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.
- HSU, H. T.; LEE, I. M.; DAVIS, R. E.; WANG, Y. C. Immunization for generation of hybridoma antibodies specifically reacting with plants infected with a mycoplasma-like organism (MLO) and their use in detection of MLO antigens. **Phytopathology**, v. 80, p. 946-950, 1990.
- KIRKPATRICK, B. C.; SMART, C. D.; GARDNER, S. L.; GAO, J.-L.; AHRENS, U.; MAURER, R.; SCHNEIDER, B.; LORENZ, K.-H.; SEEMULLER, E.; HARRISON, N. A.;

NAMBA, S.; DAIRE, X. Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. **IOM Letters**, v. 3, p. 228-229, 1994.

KISON, H.; SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E. Restriction fragment length polymorphism within the apple proliferation mycoplasma-like organism. **Journal of Phytopathology**, v. 141, p. 395-401, 1994.

LANA, U. G. P. **Caracterização molecular do gene de tolerância ao alumínio *AltSB* em sorgo**. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

LEE, I.-M.; DAVIS, R. E.; HIRUKI, C. Genetic relatedness among clover proliferation mycoplasma-like organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3565-3569, 1991.

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

LI, S.; DE BOER, S. H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. **Phytopathology**, v. 85, p. 837-842, 1995.

LIM, P. O.; SEARS, B. B. DNA sequence of the ribosomal protein genes *rpl2* and *rps19* from a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. **FEMS Microbiology Letters**, v. 84, p. 71-74, 1991.

LIN, C. P.; CHEN, T.-A. Monoclonal antibodies against the aster yellows agent. **Science**, v. 227, p. 1233-1235, 1985.

LORENZ, K. H.; SCHNEIDER, B.; AHRENS, U.; SEEMULLER, E. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. **Phytopathology**, v. 85, p. 771-776, 1995.

MURRAY, R. G. E.; SCHLEIFER, K. H. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 174-176, 1994.

NAULT, L. R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host range, and vectors. **Phytopathology**, v. 70, p. 659-662, 1980.

NAULT, L. R.; DELONG, D. M.; TRIPLEHORN, B. W.; STYER, W. E.; DOEBLEY, J. F. More on the association of *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae) with Mexican *Tripsacum* (Poaceae), including the description of two new species of leafhoppers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 76, p. 305-309, 1983.

NICOLAISEN, M.; BERTACCINI, A. An oligonucleotide microarray-based assay for identification of phytoplasma 16S ribosomal groups. **Plant Pathology**, v. 56, p. 332-336, 2007.

OLIVEIRA, E.; LAUNDAU, E. C.; DE SOUSA, S. M. Simultaneous transmission of phytoplasma and spiroplasma by leafhopper and symptoms of infected maize. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, p. S99, 2015.

OLIVEIRA, E.; DE SOUSA, S. M.; LAUNDAU, E. C. Transmission of maize bushy stunt phytoplasma by *Dalbulus maidis* leafhopper. **Bulletin of Insectology**, v. 64, p. S153-S154, 2011.

OZBEK, E.; MILLER, S. A.; MEULIA, T.; HOGENHOUT, S. Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, p. 167-175, 2003.

PALOMERA, V.; BERTIN, S.; RODRIGUEZ, A.; BOSCO, D.; VIRLA, E.; MOYA-RAYGOZA, G. Is there any genetic variation among native mexican and argentinian populations of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae)? **Florida Entomologist**, v. 95, p. 150-155, 2012.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley, Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SCHNEIDER, B.; GIBB, K. S.; SEEMULLER, E. Sequence and RFLP analysis of elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. **Microbiology**, v. 143, p. 3381-3389, 1997.

SCHNEIDER, B.; SEEMULLER, E. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3409-3412, 1994.

SCHNEIDER, B.; SEEMULLER, E.; SMART, C. D.; KIRKPATRICK. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, 1995. v. 1, p. 369-380.

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

TORRES, E.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; MONTÓN, C.; MARTÍN, M. P. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 334-340, 2005.

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.

WEI, W.; OPGENORTH, D. C.; DAVIS, R. E.; CHANG, C.-J.; SUMMERS, C. G.; ZHAO, Y. Characterizations of a novel adhesion-like gene and design of a real-time PCR for rapid, sensitive, and specific detection of *Spiroplasma kunkelii*. **Plant Disease**, v. 90, p. 1233-1238, 2006.

Capítulo 3

Identificação, taxonomia e comportamento biológico de fitoplasmas

Assunta Bertaccini



Os fitoplasmas foram descobertos há quase 50 anos, e foram inicialmente denominados organismos-tipo-micoplasmas (DOI et al., 1967). A evidência de que numerosas doenças de amarelecimento de plantas, que se acreditava serem causadas por vírus, estavam associadas com a colonização do floema por procariontes foi mostrada por prova biológica indireta, tal como observação por microscopia eletrônica, eliminação de fitoplasma e sintomas após tratamento com tetraciclina (ISHIIE et al., 1967), e transmissão experimental por inseto e por cuscuta, para plantas hospedeiras.

Essas bactérias sem parede celular, membros da classe Mollicutes, habitam os elementos crivados do floema, e são transmitidas e disseminadas primariamente por cigarrinhas e psílidos que se alimentam no floema de plantas infectadas. Os fitoplasmas interagem com seus hospedeiros de maneira estreita, manipulando as características morfológicas das plantas e, em vários casos, também a biologia dos seus insetos-vetores (HOGENHOUT et al., 2008). Provas finais dos seus papéis como agentes etiológicos na maioria das doenças das plantas ainda estão faltando em razão da falta de satisfação do postulado de Koch. Além disso, os fitoplasmas precisam ser referidos como organismos relacionados aos sintomas das doenças que eles estão sustentando. Um sintoma comum nas plantas é filoidia, uma condição na qual estruturas como folhas são produzidas em vez de flores, pela desregulação dos genes envolvidos na formação de flores (PRACROS et al., 2006). Plantas infectadas com fitoplasmas podem também mostrar virescência, o desenvolvimento de flores verdes por causa da perda do pigmento nas células da pétala, que é muito frequentemente acompanhada pela esterilidade das flores (LEE et al., 2000). Amarelecimento das folhas é também comumente relatado, e isto é devido à modificação na síntese e transporte de carboidratos e fotossíntese. A expressão induzida dos genes da sucrose-sintase e álcool-desidrogenase I, em plantas de uva infectadas com fitoplasmas, cultivadas em campo, tem sido também demonstrada (HREN et al., 2009). Muitas plantas infectadas com fitoplasmas adquirem aparência de arbusto ou de vassoura-de-bruxa, por causa de mudanças no seu padrão de crescimento normal, principalmente relacionado à perda da dominância apical causada pela proliferação de brotos axilares e redução no crescimento de internódios. Os fitoplasmas podem

induzir muitos outros sintomas não específicos, resultantes do estresse ao qual as plantas hospedeiras são submetidas.

Morfologia, biologia e genômica

Os fitoplasmas são pleomórficos (Figura 1), com diâmetros menores que 1 micrômetro, e genomas muito pequenos (680 kb a 1.600 kb) quando comparados àqueles dos seus ancestrais, porque a eles faltam várias rotas metabólicas (BAI et al., 2006). Eles divergiram das bactérias Gram-positivas e são apontados como gênero '*Candidatus Phytoplasma*' (IRPCM, 2004). As sequências do genoma inteiro estão sendo completadas para duas estirpes de "aster yellows" ('*Candidatus Phytoplasma asteris*'), duas estirpes de '*Ca. P. australiense*', e uma estirpe de '*Ca. P. mali*' (OSHIMA et al., 2004; BAI et al., 2006; KUBE et al., 2008; TRAN-NGUYEN et al., 2008; ANDERSEN et al., 2013). Esses sequenciamentos estão proporcionando oportunidade para o estudo de mecanismos moleculares das interações patógeno-hospedeiro, e também início de especulações sobre sua capacidade de virulência.

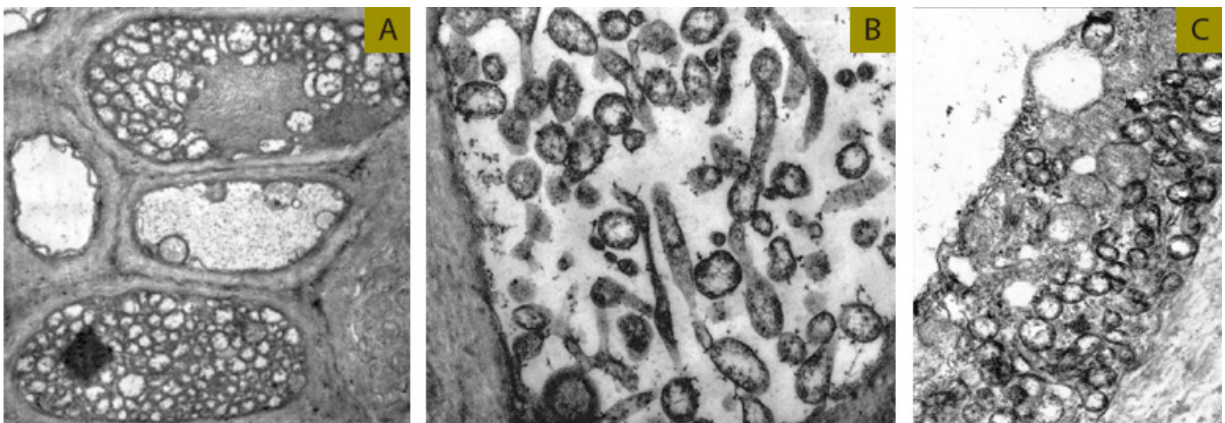


Figura 1. Fotomicrografia em microscópio eletrônico de secções ultrafinas de tecidos do floema infectados com fitoplasmas: dois tubos cheios com os procariotos (X6.000) (A), de perto, de fitoplasmas mostrando grande polimorfismo em forma e tamanho (X12.000) (B), e fitoplasmas no citoplasma de tubos jovens (X10.000) (C).

Fotos: Assunta Bertaccini

Os fitoplasmas são introduzidos pelo inseto-vetor, durante a atividade de alimentação, dentro dos elementos dos tubos crivados, de onde eles se espalham sistemicamente. Em muitos casos, cada fitoplasma distinto é transmitido por um vetor diferente, em diferentes regiões geográficas. Contudo, também infecções mistas são comuns, mas pouco é conhecido se infecções mistas similares ocorrem nos insetos-vetores tão frequentemente quanto ocorrem em plantas. As cigarrinhas *Circulifer tenellus* e *Dalbulus elimatus* carregam fitoplasma e espiroplasma, e cada uma pode transmitir ambos os patógenos (LEE et al., 1998a). As infecções mistas por fitoplasma parecem ser mais comuns onde o cultivo é mais intensivo e cultivo misto é prática de rotina; sob essas condições, insetos-vetores polípagos podem se alimentar em plantas não hospedeiras e torná-las infectadas, se elas forem susceptíveis ao(s) fitoplasma(s) carregados por esses vetores visitantes. Esse fitoplasma pode ser então exposto a novos grupos de insetos-vetores e começar a estabelecer novo ciclo biológico e ecológico, terminando, muito frequentemente, em um surto de uma nova doença.

A transmissão transovariana de fitoplasmas ocorre em algumas combinações inseto-vetor-fitoplasma: *Scaphoideus titanus*/"aster yellows" (ALMA et al., 1997); *Hishimonoides sellatiformis*/"mulberry dwarf" (KAWAKITA et al., 2000), *Matsumuratettix hiroglyphicus*/"sugarcane white leaf" (HANBOONSONG et al., 2002), e *Cacopsylla melanoneural*/"plum" (TEDESCHI et al., 2006).

Estudos sobre o crescimento comercial in vitro de plântulas de alfafa

mostraram evidência da transmissão de fitoplasma por sementes. Os dados foram depois confirmados por meio de testes moleculares em plântulas de limão-galego, tomate, milho, nabo e canola infectadas por fitoplasma, mantidas in vitro ou em condições à prova de insetos e também em plantas assintomáticas de petúnia (KHAN et al., 2002; BOTTI; BERTACCINI, 2006; CALARI et al., 2011; CHUNG; JEONG, 2014).

Uma das vias mais importantes de disseminação de fitoplasma é também representada pela propagação vegetativa, tais como enxertia, produção de corte, práticas de micropropagação, e algum outro método usado para multiplicar material de planta que evita a reprodução sexual.

Os fitoplasmas possuem o menor genoma entre as bactérias patogênicas de plantas, contudo, duplicação e redundância de genes, junto com diferenças no tamanho do cromossomo, têm sido relatadas, e muitos genes constitutivos estão presentes em múltiplas cópias, e, em particular, eles contêm dois rRNA operons que, em vários casos, mostram heterogeneidade de sequência. No genoma do fitoplasma “onion yellows” (OY), estima-se que 18% do total de genes são múltiplas cópias redundantes de cinco genes: *uvrD* (ATP-dependente DNA helicase), *hflB* (ATP-dependente Zn protease), timidilato quinase (*tmk*), DNA metilase (*dam*), e *ssb* (proteína de ligação DNA-fita simples) (OSHIMA et al., 2004). Aos fitoplasmas faltam muitos genes para funções metabólicas padrão e não têm rotas de recombinação homólogas funcionando, mas têm a rota de transporte Sec (a principal rota de translocação de proteínas através de várias membranas das células) (BAI et al., 2006). A ausência de importantes funções nos fitoplasmas pode ser resultado de evolução redutiva, como consequência da vida como parasitas intracelulares,

em ambientes ricos em nutrientes. Como outros mollicutes, ao fitoplasma OY faltam genes para a biossíntese de aminoácidos e ácidos graxos, o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), e fosforilação oxidativa (produção de ATP). Ao contrário dos micoplasmas, ao genoma dos fitoplasmas também faltam genes para o sistema da fosfotransferase e para metabolização UDP-galactose para glicose 1-fosfato, sugerindo que eles possuem um açúcar de entrada e sistema metabólico único. Em adição, aos fitoplasmas faltam o ciclo da pentose-fosfato, a rota da arginina-deidrolase, e subunidades da ATP-sintase, as quais, se pensa, são essenciais para a vida. Isso sugere que os fitoplasmas importam ATP do hospedeiro ou, alternativamente, a síntese de ATP pode ser fortemente dependente da glicólise. Embora genes metabólicos sejam escassos, os genomas dos fitoplasmas contêm muitos genes codificadores dos sistemas transportadores; isso sugere agressiva importação de muitos metabólitos das células hospedeiras que, provavelmente, desarranjam o balanço metabólico e causam os sintomas da doença. O genoma de fitoplasma codifica também genes da síntese folato os quais podem permitir aos fitoplasmas se adaptar aos ambientes muito diferentes, da planta e do inseto (OSHIMA et al., 2004).

Os genomas dos fitoplasmas contêm também números relativamente grandes de genes transposons únicos e sequências de inserção (JOMANTIENE; DAVIS, 2006; WEI et al., 2008). DNA extracromossômico ou plasmídeos de vários tamanhos, alguns de origem viral, são também reportados (KUBOYAMA et al., 1998; REKAB et al., 1999; NISHIGAWA et al., 2001, 2002; OSHIMA et al., 2001a). Em estirpes do *onion yellows* (OY), a estirpe transmitida por inseto, brandamente patogênica (OY-M), contém dois tipos de plasmídeos, cada qual possui um gene codificando a suposta

proteína transmembrana ORF3. Da mesma forma, a estirpe não transmitida por inseto (OY-NIM) tem um correspondente desses plasmídeos, faltando ORF3. Foi demonstrado que na OY-M, ORF3 foi transcrita de dois supostos promotores, enquanto na OY-NIM uma das sequências promotoras foi mutada e a outra anulada, e, por isso, ORF3 não foi expressa. Além disso, a proteína ORF3 pareceu mais especificamente expressa nos insetos infectados por OY-M do que nas plantas, sugerindo que ela pode desempenhar um importante papel nas interações de estirpes de fitoplasma com os seus insetos hospedeiros (ISHII et al., 2009).

O crescimento preliminar de fitoplasma em meio artificial, a partir de brotos infectados de vinca micropropagados, tem sido reportado (CONTALDO et al., 2012; BERTACCINI et al., 2014). Quando observadas ao microscópio binocular, as colônias obtidas de culturas em meio líquido são comparáveis em tamanho e morfologia às daquelas de outros mollicutes cultivados (Figura 2). Testes de PCR/RFLP e sequenciamento usando primers específicos confirmaram que o DNA do fitoplasma estava presente nessas colônias. Recentemente, isolamento de fitoplasma foi também obtido de plantas naturalmente infectadas, como uva (CONTALDO et al., 2014).

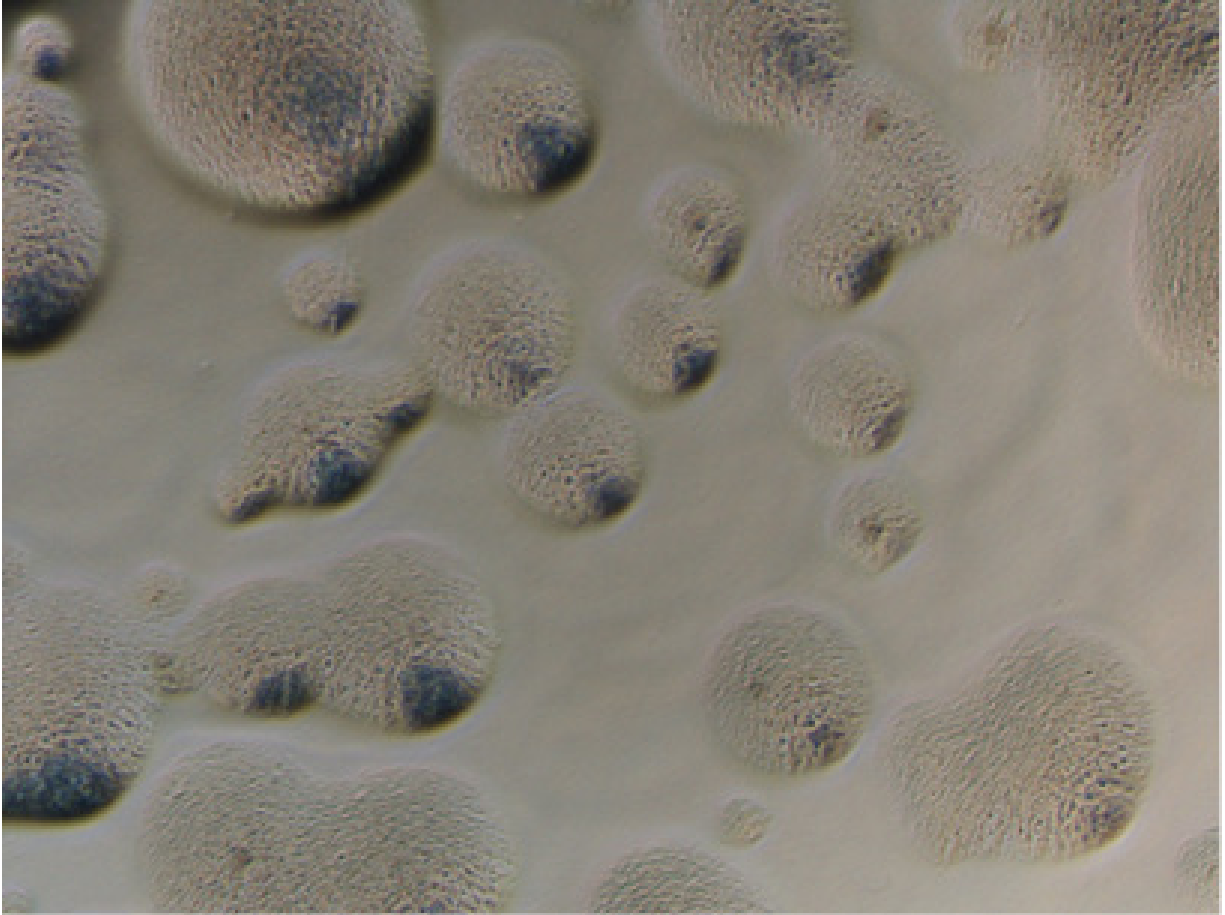


Figura 2. Colônias de fitoplasma de uva infectada em campo, fotografadas com ampliação de 40 x.

Foto: Nicoletta Contaldo

Detecção, identificação molecular e taxonomia

Sem a estrita inspeção quarentenária, materiais de plantas infectadas com fitoplasma podem ser introduzidos através do intercâmbio internacional de germoplasmas, tais como brotos, rizomas, tubérculos, e outros materiais de propagação, em novas regiões geográficas onde a vegetação nativa e as espécies de insetos-vetores são diferentes daquelas presentes na região de

origem. Se espécies de plantas susceptíveis e vetores acessíveis para sustentar o crescimento e a disseminação de fitoplasma(s) introduzidos estiverem no local, um novo nicho ecológico é criado e muito frequentemente, segue um surto epidêmico severo. A detecção sensível e acurada desses microrganismos é, por isso, um pré-requisito para o manejo de doenças associadas a fitoplasma, bem como para evitar a sua disseminação pelo mundo inteiro.

A microscopia eletrônica representou um dos principais procedimentos de indexação, juntamente com a transmissão por enxertia em plantas susceptíveis indicadoras, e o uso de corantes DNA-específicos. Contudo, essas técnicas não têm capacidade para diferenciar ou para classificar fitoplasmas, o que é necessário para se realizar o seu manejo correto. Protocolos para a produção de antígenos fitoplasma-específicos enriquecidos foram desenvolvidos para permitir a detecção sorológica, contudo ganharam pouca aplicação, por causa das dificuldades para produção de antissoros (CLARK et al., 1989; FOS et al., 1992; CHEN et al., 1994). A detecção e a identificação de fitoplasmas são agora feitas, rotineiramente, principalmente, por técnicas de ácidos nucleicos desenvolvidas nos últimos 25 anos, que são adequadas para detecção de fitoplasmas em materiais de plantas e de insetos-vetores.

O desenvolvimento de ferramentas de base molecular e, em particular, reação em cadeia da polimerase (PCR) fitoplasma-específica universal (genérica) ou fitoplasma-grupo-específica, com primers desenhados com base nas sequências altamente conservadas do gene ribossomal 16S RNA (rRNA) (LEE et al. 1998b; BERTACCINI, 2007; DUDUK et al., 2013), tornou possível identificar um amplo conjunto de fitoplasmas. As sondas

moleculares fitoplasma-específicas e os procedimentos de testes sensíveis, desenvolvidos principalmente baseados em análises PCR/RFLP e sequenciamento, têm permitido a determinação da identidade de fitoplasmas associados com muitas doenças de plantas e insetos-vetores. Detecções de estirpes de fitoplasmas e/ou de infecções mistas por fitoplasmas, que resultaram ser de relevância epidemiológica para o manejo de surtos da doença, em várias espécies importantes, tais como uva, milho, coco, citros, amêndoa e outras, foram relatadas (LEE et al., 1995; ALMA et al., 1996; TYMON et al., 1998; MARTINI et al., 1999; ANGELINI, et al., 2001; PALERMO et al., 2004; DUDUK; BERTACCINI, 2006; BOTTI; BERTACCINI, 2007; MOLINO LOVA et al., 2011; VILLALOBOS et al., 2011; MORI et al., 2013). Essa metodologia foi também aplicada com sucesso para detectar a presença de fitoplasma em germoplasma micropropagado, e também em plantas ornamentais nas quais a presença de fitoplasma induz características desejáveis, como a possibilidade de crescer em vasos sem a necessidade do uso de químicos indutores de nanismo (BERTACCINI et al., 1996; LEE et al., 1997; TIAN et al., 2000). Esses trabalhos revelaram também que a identidade dos fitoplasmas é, frequentemente, completamente inconsistente com os sintomas que eles induzem nas plantas susceptíveis. Sintomas similares podem ser induzidos por vários tipos distintos de fitoplasmas ou outros procariontes, enquanto vários tipos de sintomas podem ser induzidos por fitoplasmas estreitamente relacionados (Figura 3)(BERTACCINI et al., 1995; PADOVAN et al., 1995; DAVIS et al., 1997; OSHIMA et al., 2001b; DUDUK; BERTACCINI, 2006; CHEN et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009).









Figura 3. Sintomas de doenças associadas a fitoplasma em algumas espécies de plantas: 'vassoura--de-bruxa' do limão (A); amarelecimento do pessegueiro (B); 'vassoura-de-bruxa' da jujuba (C); amarelo-da-cebola (*Allium cepa*) (esquerda inflorescência sadia) (D); filoidia-da-equinácea (*Echinacea purpurea*) (E); e amarelo-da-corriola (trepadeira) (*Convolvulus arvensis*) (planta sadia à esquerda) (F).

Fotos: Assunta Bertaccini

Os fitoplasmas não podem ser diferenciados e classificados usando critérios fenotípicos biofísicos e bioquímicos, que são rotineiramente utilizados para outros microrganismos. Coleções-referência de estirpes de fitoplasmas estão disponíveis para propósitos de pesquisa e classificação (BERTACCINI et al., 1992). Análises da sequência de rDNA 16S mostram que os fitoplasmas constituem um táxon coerente ao nível de gênero; neste ramo monofilético, grupos e subgrupos têm sido delineados, muitos dos quais são agora

espécies sob o status provisório '*Candidatus*'. Uma descrição de espécie '*Candidatus Phytoplasma*' deve referir-se somente à única sequência do gene que codifica o 16S rRNA (>1.200 bp) tendo menos de <97,5% de similaridade com alguma espécie '*Ca. Phytoplasma*' previamente descrita (IRPCM, 2004). O esquema completo de classificação de fitoplasma é baseado em análises do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) da reação (PCR) amplificada 16S rDNA, que proporciona ferramenta fidedigna para ampla diferenciação de fitoplasmas em grupos e subgrupos (LEE et al., 1998a). Estudos recentes permitem a identificação de fitoplasmas preliminarmente pelo "*i*phyclassifier" (WEI et al., 2007; ZHAO et al., 2009). Contudo, esse tipo de classificação deveria ser considerado como indicativo, já que é baseado apenas em uma sequência, e deveria ser apoiado com dados reais de um consistente número de estirpes para uma classificação confiável dos fitoplasmas associados com doença. Tem sido demonstrado que os grupos de fitoplasmas 16Sr, baseados em RFLP, são consistentes com os ramos definidos por análises filogenéticas das sequências de comprimento quase completo do gene que codifica o 16S rRNA e também em alguma extensão, para diversos '*Candidatus Phytoplasma*' (Tabela 1, Figura 4). Por causa da natureza altamente conservada do gene que codifica o 16S rRNA, muitas estirpes de fitoplasmas biologicamente ou ecologicamente distintas podem afiançar designação como novo táxon, mas estes podem falhar para satisfazer o requerimento para novo '*Ca. Phytoplasma*' ou designação em subgrupo. Adicionalmente, propriedades biológicas únicas, tais como especificidade de anticorpo, gama de hospedeiros, e especificidade de transmissão pelo vetor, precisam também ser incluídas na sua diferenciação (SEEMÜLLER; SCHNEIDER, 2004; DUDUK;

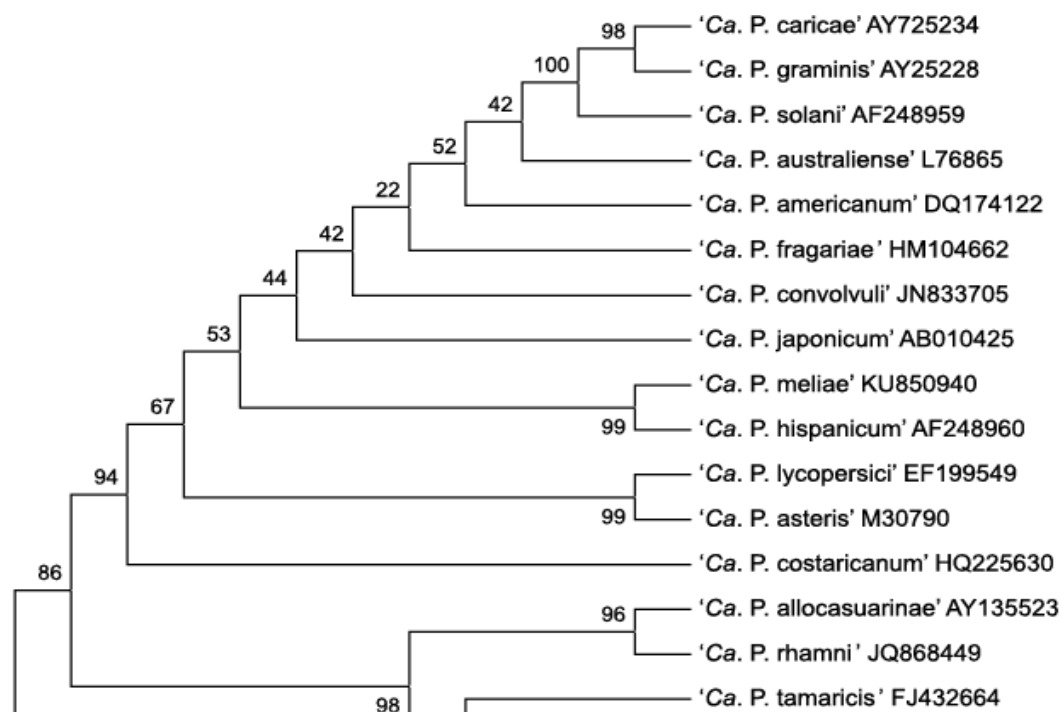
BERTACCINI, 2011). Um número de marcadores genéticos adicionais, como a região espaçadora intergênica dos genes que codificam 16S-23S rRNA, genes da proteína ribossomal (*rp*), *secY*, *secA*, *tuf*, *vmp1*, *groEL*, foram estudados e primers foram desenvolvidos, especificamente para detecção de fitoplasmas, como ferramentas suplementares em direção ao refinamento da diferenciação de estirpes e estudos epidemiológicos mais efetivos (SMART et al., 1996; SCHNEIDER et al., 1997; MARTINI et al., 2002, 2007; LEE et al., 2006, 2010, 2012; HODGETTS et al., 2008; CIMERMAN et al., 2009; MITROVIC et al., 2011; 2015). Além disso, para a maioria dos fitoplasmas mantidos em coleção (BERTACCINI, 2015) um sistema de identificação em código de barras foi estabelecido em dois genes, por exemplo, 600 pb no início do gene ribossomal 16S e 500 pb no gene *tuf* (MAKAROVA et al., 2012; CONTALDO et al., 2015). O uso cruzado de mais marcadores moleculares confirmou a presença de fitoplasma associada a surtos epidêmicos severos, em muitos diferentes cultivos, no mundo, permitindo melhorar o manejo dessas doenças (MARTINI et al., 2002; LEE et al., 2003; LANGER; MAIXNER, 2004; ARNAUD et al., 2007; ALVAREZ et al., 2009, 2014).

Tabela 1. ‘*Candidatus* Phytoplasmas’ oficialmente descritos.

<i>Espécies Candidatus</i>	Estirpe (sigla)	Subgrupo 16Sr	Distribuição geográfica	Referências
‘ <i>Ca. P. asteris</i> ’	Aster yellows (MAY)	16SrI-B	Mundial	Lee et al. (2004)
‘ <i>Ca. P. lycopersici</i> ’	“Brote grande” of tomato	16SrI-Y	Bolívia	Arocha et al. (2007)
‘ <i>Ca. P. aurantifolia</i> ’	Lime witches’ broom (WBDL)	16SrII-B	Península Arábica	Zreik et al. (1995)
‘ <i>Ca. P. australasia</i> ’	Papaya mosaic (PpM)	16SrII-D	Austrália, África, Ásia	White et al. (1998)
‘ <i>Ca. P. pruni</i> ’	Peach X-disease (PX11CT1)	16SrIII-A	América do Norte	Davis et al. (2013)
‘ <i>Ca. P. ulmi</i> ’	Elm yellows (EY)	16SrV-A	Europa, América	Lee et al. (2004a)
‘ <i>Ca. P. ziziphi</i> ’	Jujube witches’ broom (JWB-G1)	16SrV-B	Ásia	Jung et al. (2003)
‘ <i>Ca. P. rubi</i> ’	Rubus stunt (RuS)	16SrV-E	Europa	Malembic-Maher et al. (2011)
‘ <i>Ca. P. balanitae</i> ’	Balanite witches’ broom (BltWB)	16SrV-F	Miamar	Win et al. (2013)
‘ <i>Ca. P. trifolii</i> ’	Clover proliferation (CP)	16SrVI-A	América, Ásia, Europa	Hiruki et al. (2004)
‘ <i>Ca. P. sudamericanum</i> ’	Passionfruit (WB-Br4)	16SrVI-I	Brasil	Davis et al. (2012)
‘ <i>Ca. P. fraxini</i> ’	Ash yellows (AshY)	16SrVII-A	América, Europa	Griffiths et al. (1999)
‘ <i>Ca. P. phoenicium</i> ’	Almond witches’ broom (AIWB)	16SrIX-B	Ásia	Verdin et al. (2003)
‘ <i>Ca. P. mali</i> ’	Apple proliferation (AP)	16SrX-A	Europa	Seemüller e Schneider (2004)
‘ <i>Ca. P. prunorum</i> ’	European stone fruit yellows (ESFY)	16SrX-B	Europa	Seemüller e Schneider (2004)

<i>Espécies Candidatus</i>	Estirpe (sigla)	Subgrupo 16Sr	Distribuição geográfica	Referências
'Ca. P. pyri'	Pear decline (PD)	16SrX-C	Europa	Seemüller e Schneider (2004)
'Ca. P. spartii'	Spartium witches' broom (SpaWB)	16SrX-D	Europa	Marcone et al. (2003)
'Ca. P. oryzae'	Rice yellow dwarf (RYD)	16SrXI-A	Ásia	Jung et al. (2003a)
'Ca. P. cirsii'	Cirsium yellows	16SrXI-E	Europa	Safora et al. (2016)
'Ca. P. solani'	Stolbur (STOL11)	16SrXII-A	Mundial	Quaglino et al. (2013)
'Ca. P. australiense'	Australian grapevine yellows (AUSGY)	16SrXII-B	Austrália	Davis et al. (1997)
'Ca. P. japonicum'	Japanese hydrangea phyllody	16SrXII-D	Japão, China	Sawayanagi et al. (1999)
'Ca. P. fragariae'	Yellows diseased strawberry (StrawY)	16SrXII-E	Lituânia	Valiunas et al. (2006)
'Ca. P. convolvuli'	Bindweed yellows (BY-S57/11)	16SrXII-H	Europa	Martini et al. (2012)
'Ca. P. hispanicum'	Mexican periwinkle virescence (MPV)	16SrXIII-A	América	Davis et al. (2016)
'Ca. P. meliae'	China tree yellows phytoplasma (ChTY)	16SrXIII-G	Argentina e Bolívia	Fernandez et al. (2016)
'Ca. P. cynodontis'	Bermudagrass white leaf (BGWL)	16SrXIV-A	Ásia, Europa	Marcone et al. (2003a)
'Ca. P. brasiliense'	Hibiscus witches' broom (HibWB)	16SrXV-A	América do Sul	Montano et al. (2001)
'Ca. P. graminis'	Sugarcane yellow leaf syndrome	16SrXVI-A	Cuba	Arocha et al. (2005)
'Ca. P. caricae'	Papaya bunchy top	16SrXVII-A	Cuba	Arocha et al. (2005)
'Ca. P. americanum'	American potato purple top wilt	16SrXVIII-A	EUA	Lee et al. (2006)

Espécies Candidatus	Estirpe (sigla)	Subgrupo 16Sr	Distribuição geográfica	Referências
'Ca. P. castaneae'	Chestnut witches' broom	16SrXIX-A	Ásia	Jung et al. (2002)
'Ca. P. rhamnii'	Rhamnus witches' broom	16SrXX-A	Europa	Marcone et al. (2003)
'Ca. P. pini'	Pinus phytoplasma (PinP)	16SrXXI-A	Europa, África	Schneider et al. (2005)
'Ca. P. palmicola'	Coconut lethal yellowing (LYDM)	16SrXXII-A	África	Harrison et al. (2014)
'Ca. P. omanense'	Cassia witches' broom (CaWB)	16SrXXIX-A	Oman	Al-Saady et al. (2008)
'Ca. P. tamaricis'	Salt cedar witches' broom	16SrXXX-A	China	Zhao et al. (2009)
'Ca. P. costaricanum'	Soybean stunt (SoyST1c1)	16SrXXXI-A	Costa Rica	Lee et al. (2011)
'Ca. P. malaysianum'	Malaysian periwinkle virescence (MaPV)	16SrXXXII-A	Malasia	Nejat et al. (2012)
'Ca. P. allocasuarinae'	Allocasuarina phytoplasma	16SrXXXIII-A	Australia	Marcone et al. (2003)



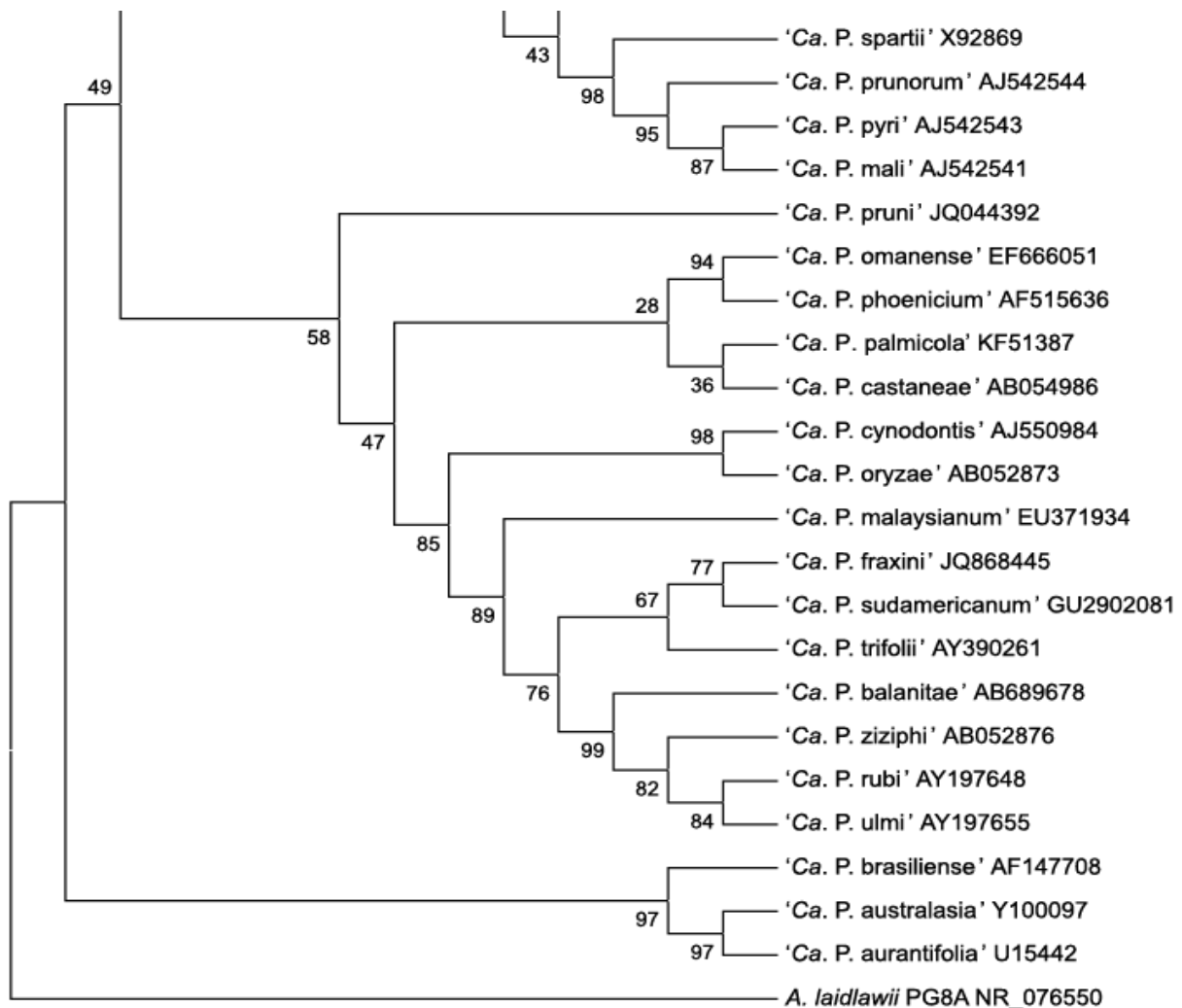


Figura 4. Parentesco evolucionário de ‘*Candidatus Phytoplasma*’ disponível como descrição completa. A história evolucionária foi inferida usando o método “Neighbor-Joining” (SAITOU; NEI, 1987). A percentagem de árvores repetidas nas quais os táxons se agruparam no teste “bootstrap” (1.000 repetições) é mostrada seguindo as ramificações (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias evolucionárias foram computadas usando o método “Maximum Composite Likelihood” (TAMURA et al., 2004) e estão em unidades do número de substituição de bases por sítio. Análises

evolucionárias foram conduzidas em MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

Os fitoplasmas se espalham sistemicamente nas plantas, mas nunca se estabelecem nos meristemas; eles são pleomórficos e suficientemente pequenos para passar através dos tubos crivados, sendo levados ao longo do fluxo de assimilados das folhas, para os órgãos da planta consumidores de açúcares. Contudo, estudos focando sua translocação após inoculação localizada (WEI et al., 2004) ou sua recolonização de árvores (GARCIA-CHAPA et al., 2003) fornecem evidência que a translocação de fitoplasmas não pode ser explicada apenas pelo fluxo de assimilados; isto está confirmado pela sua detecção pela microscopia eletrônica em células jovens do floema em desenvolvimento (Figura 1).

Para a detecção eficaz de fitoplasma em plantas infectadas, deve ser também considerado que o título de fitoplasma varia grandemente não apenas nas diferentes partes da planta, mas também de planta para planta, como demonstrado por um número de testes de PCR quantitativo desenvolvidos (BERGES et al., 2000; BARIC; CHRISTENSEN et al., 2004; DALLA-VIA, 2004; MARZACHÌ; BOSCO, 2005). Espécies de plantas com diferente susceptibilidade têm sido relatadas; além disso, diferentes estirpes do mesmo fitoplasma podem atingir diferentes concentrações nos hospedeiros infectados. Em experimentos de coinoculação foi demonstrado que uma estirpe agressiva do fitoplasma “ash yellows” foi detectada mais cedo e mais frequentemente que uma estirpe menos agressiva, além disso, diferenças na agressividade de estirpes de fitoplasmas foram também detectadas usando ambas as metodologias, biológica e molecular (CARRARO et al., 1998; SINCLAIR; GRIFFITHS, 2000; SEEMÜLLER et al., 2010).

Interações com hospedeiros

O metabolismo da energia é certamente a chave para a compreensão das interações dos fitoplasmas com os hospedeiros. Efeitos de níveis alterados de oxigênio e de dióxido de carbono na abundância de fitoplasma em cultura de meristema apical de *Oenothera* e ocorrência de mudanças na concentração de carboidratos no floema, raízes e folhas de plantas infectadas com fitoplasma têm sido observados (SEARS et al., 1997; LEPKA et al., 1999; MAUST et al., 2003). Por causa do amplo conjunto de sintomas nas plantas doentes, a redução nutricional não está restrita aos açúcares, mas pode incluir outros compostos. Fotossíntese prejudicada, acumulação de carboidratos nas folhas maduras e decréscimo no conteúdo de amido nos tecidos-dreno, tais como raízes, frequentemente descritos para infecção por fitoplasma, parecem ser efeitos secundários e estão provavelmente relacionados à inibição do transporte no floema. Acredita-se que a acumulação de carboidratos nas folhas-fonte resulta em inibição da fotossíntese por retroalimentação, causando clorose (LEPKA et al., 1999; BERTAMINI; NEDUNCHEZHIAN, 2001; BERTAMINI et al., 2002; MAUST et al., 2003). Genes de fitoplasma codificam transportadores malato e enzima málica para conversão da malato em piruvato. No “aster yellows witches’ broom” (AYWB) a enzima málica tem atividade de descarboxilação oxidativa do malato, convertendo malato em piruvato e CO₂ com a redução de NAD ou NADP, além disso, enzima semelhante a AYWB PduL abriga atividade fosfotransacetilase. Como características similares foram também identificadas em ‘Ca. P. mali’, geração de energia e poder de redução do malato está, portanto, presente nos fitoplasmas (SAIGO et al., 2014; SIEWERT et al., 2014).

Uma redução decisiva na translocação no floema pode ser esperada quando os fitoplasmas se multiplicam a tal nível que o lúmen dos elementos crivados é entupido. Contudo, reduzida translocação tem sido também observada em plantas com baixo título de fitoplasma, sugerindo uma influência mais direta deste parasita no metabolismo do hospedeiro e função do floema.

A ocorrência de epitopos principais e únicos na superfície de cada espécie de fitoplasma sugere que eles são participantes-chaves nas interações específicas com as células dos hospedeiros. Genes codificando essas proteínas têm sido detectados em vários grupos de fitoplasmas (BERG et al., 1999; BLOMQUIST et al., 2001; BARBARA et al., 2002; MORTON et al., 2003). A proteína Amp do fitoplasma OY forma um complexo com os microfilamentos do inseto, compostos de actina e miosina, o que foi correlacionado com a capacidade de transmissão de fitoplasma por cigarrinhas (SUZUKI et al., 2006; GALETTO et al., 2011). A proteína Amp foi apontada também como sendo substrato para o sistema Sec, uma vez que ela tem a sequência-sinal Sec em seu N-terminal, a qual é clivada no 'Ca. P. asteris' OY-M, sugerindo que o sistema Sec de fitoplasmas utiliza reconhecimento e clivagem da sequência-sinal, como em outros sistemas Sec de bactérias (KAKIZAWA et al., 2001, 2004). Genes codificando Imp não mostram correlação com o gene que codifica 16S rRNA, sugerindo que a variabilidade nas proteínas imunodominantes da membrana reflete outros fatores além do tempo evolucionário. Foi detectada baixa identidade de sequência do Imp entre diferentes grupos de fitoplasma; contudo as organizações de gene flanqueando Imp foram bem conservadas na maioria dos fitoplasmas (KAKIZAWA et al., 2009). Imp pode desempenhar um importante papel nas interações fitoplasma-hospedeiro, como muitas proteínas positivamente selecionadas.

Uma vez que os fitoplasmas são parasitas intracelulares de plantas e insetos, sua habilidade para se adaptar a dois ambientes diversos foi também estudada. Análises de microarranjos de 'Ca. P. asteris' estirpe OY-M revelaram que a expressão de aproximadamente 33% dos genes muda durante a troca de hospedeiro entre planta e inseto, sugerindo que fitoplasma altera dramaticamente a expressão de genes em resposta ao seu hospedeiro, e pode também usar transportadores, proteínas secretadas, e enzimas metabólicas de uma maneira hospedeiro-específica (OSHIMA et al., 2011). Os genes codificados na estirpe 'Ca. P. asteris' AY-WB são mais altamente expressos nos insetos que nas plantas (TORUNO et al., 2010). Mais alta expressão na planta que nos insetos hospedeiros foi também reportada para a TENGU, uma pequena proteína detectada no genoma da estirpe OY-M e indução de sintomas similares àqueles induzidos pela presença de fitoplasma, em *Arabidopsis thaliana* transgênico. Embora a localização dos fitoplasmas seja restrita ao floema, TENGU foi detectada nos brotos apicais, sugerindo que foi transportada do floema para outras células; genes responsivos a auxina foram também menos regulados nas plantas transgênicas (HOSHI et al., 2009). Também os genes codificados no PMUs da estirpe AY-WB de 'Ca. P. asteris' são mais altamente expressos nos insetos que nas plantas, muito provavelmente em razão da aumentada produção do tipo circular extracromossomal de PMU durante a infecção do inseto (TORUNO et al., 2010).

Em fitoplasma "onion yellows", sintomas de moderada proliferação e amarelecimento estão presentes na infecção pela estirpe fraca (OY-M), enquanto amarelecimento, nanismo, proliferação em vassoura-de-bruxa ("witches' broom") são induzidos pela estirpe severa (OY-W). Cinco genes glicolíticos resultaram ser duplicados na estirpe

severa, e a população de fitoplasma OY-W tinha título mais alto que OY-M, levando à hipótese que consumo mais alto da fonte de carbono, por causa desta duplicação, pode afetar a taxa de crescimento do fitoplasma OY-W e produzir sintomas mais severos (OSHIMA et al., 2007). Genes da glicólise estão completamente ausentes no 'Ca. P. mali.', que possui um gene coficando 2-dehydro-3-deoxyphosphogluconato aldolase, levando à hipótese que nesse fitoplasma piruvato é formado independentemente da glicólise (KUBE et al., 2012). Mecanismos patogênicos podem ser diferentes de acordo com a estirpe e/ou as condições ambientais diversas, como diferentes espécies hospedeiras.

A identificação de proteínas efetoras, tais como SAP11, SAP54 e P38, sugere que fitoplasma poderia também agressivamente induzir sintomas pela secreção destas proteínas e modificação da atividade gene-planta (MACLEAN et al., 2011; SUGIO et al., 2011; NERIYA et al., 2014). Muito recentemente, um gene integral membrane protein (*inmp*) identificado no desenho do genoma de uma estirpe de 'Ca. P. phoenicium', e detectado em outros genomas de fitoplasma, foi proposto como possível fator de adaptação aumentada capaz de modificar respostas de defesa do hospedeiro (QUAGLINO et al., 2015).

Muito pouco é conhecido sobre a virulência de fitoplasma: fitoplasmas sequenciados não possuem gene algum de virulência conhecido (tal como *hrp*), encontrado em outras bactérias fitopatogênicas (OSHIMA et al., 2004). Contudo, a infecção por fitoplasma pode levar à produção de proteínas de defesa, aumento de compostos fenólicos e superprodução de peróxido de hidrogênio nas plantas hospedeiras (JUNQUEIRA et al., 2004; MUSETTI et al., 2005), genes de regulação para cima e para baixo (SMART et al.,

1996; JAGOUEIX-EVEILLARD et al., 2001). Um homólogo de um transportador de aminoácido foi identificado como regulado para baixo após infecção com 'Ca. P. prunorum', sugerindo um efeito de fitoplasmas no transporte de aminoácidos (CARGINALE et al., 2004).

Manejo e controle

A falta de informação sobre a ecologia de fitoplasmas tem impedido progressos na descoberta de vetores naturais que disseminam muitas doenças importantes e no delineamento de medidas eficientes de controle para doenças associadas a fitoplasma. Com o desenvolvimento de ferramentas de base molecular e de procedimentos de detecção sensíveis, algum progresso tem sido feito através de estudos de relações e interações planta-fitoplasma, mas poucos estudos têm enfatizado as relações ou interações fitoplasma-vetor.

Controle de surtos epidêmicos de doença por fitoplasma tem sido realizado pelo controle dos insetos-vetores ou pela eliminação do patógeno de plantas infectadas por cultura de meristema, antibióticos ou outros químicos. Atualmente, o controle do inseto-vetor usando inseticidas é a ferramenta de escolha, contudo, à parte as considerações ambientais, a eficácia desta alternativa não é completa, e as doenças por fitoplasma continuam a ser severas em várias áreas do mundo. Por outro lado, a remoção de fontes de inóculo é eficiente para redução das doenças por mollicutes disseminadas por insetos-vetores monófagos se alimentando em plantas afetadas, mas é difícil obter resultados quando plantas

daninhas reservatório são fontes de contaminação para cigarrinhas polífagas, e quando reservatórios e/ou vetores são desconhecidos. Similarmente, é mais fácil controlar insetos monófagos se reproduzindo em cultivos afetados que insetos capazes de viver em plantas daninhas.

A cura de plantas infectadas usando antibióticos não é praticável, porque é muito cara, proibida em alguns países, e nem sempre é eficiente para o controle dos patógenos, em longo prazo. A alternativa mais eficiente para controle da infecção por fitoplasma, em curto período, é evitar os surtos pela produção de material de planta limpo, ou pela obtenção de variedades resistentes. Também falta conhecimento sobre os mecanismos de resistência da planta hospedeira aos fitoplasmas, mas a escassez de estratégias efetivas de manejo para essas doenças confere alta prioridade a essas questões. Continuam sendo feitos esforços para identificar germoplasma codificando resistência natural aos mollicutes, e para incorporar genes em várias culturas e árvores frutíferas e florestais, via seleção em programas de melhoramento. Essa resistência pode incluir resistência aos patógenos ou aos insetos-vetores. Proteínas das plantas relacionadas à defesa, conhecidas por serem ativas nas respostas do hospedeiro à invasão por outros tipos de patógenos, podem também ser efetivas nas respostas à infecção por mollicutes.

Trabalhos preliminares de cultivo e extensivo sequenciamento de genoma, para comparar e contrastar rotas metabólicas de estirpes virulentas representativas, podem auxiliar no delineamento de estratégias visando tratamentos efetivos ou métodos de prevenção de doenças por fitoplasma mais efetivos. Além disso, deveria ser obtido conhecimento mais detalhado sobre os mecanismos básicos que regulam a sobrevivência de fitoplasmas, os quais estão entre os

menores organismos que se autorrePLICAM. Essas pesquisas são urgentemente necessárias porque o uso de tetraciclina é proibido em algumas áreas agrícolas (Europa) já que se entende que coloca em risco a saúde humana. O reconhecimento da resistência durável a doenças por fitoplasmas é o único meio de controle efetivo dessas doenças em longo prazo. A seleção e o melhoramento de plantas com resistência à infecção por fitoplasma, assim como o estudo das formas de colonização das plantas por fitoplasma e insetos-vetores, são outras possíveis aplicações. Por essa razão, estratégias visando o tratamento e/ou a prevenção de doenças de plantas relacionadas a fitoplasma devem ser melhor definidas e mais efetivas. O resultado esperado para isso poderia ser a intensificação da capacidade para reduzir impactos socioeconômicos, que as doenças por fitoplasma têm causado em todas as áreas agrícolas do planeta.

Referências

- ALMA, A.; BOSCO, D.; DANIELLI, A.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; ARZONE, A. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. **Insect Molecular Biology**, v. 6, p. 115-121, 1997.
- ALMA, A.; DAVIS, R. E.; VIBIO, M.; DANIELLI, A.; BOSCO, D.; ARZONE, A.; BERTACCINI, A. Mixed infection of grapevines in northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP *subgroup 16Srl-B* strains previously unreported in this host. **Plant Disease**, v. 80, p. 418-421, 1996.
- ALVAREZ, E.; MEJIA, J. F.; CONTALDO, N.; PALTRINIERI, S.; DUDUK, B.; BERTACCINI, A. '*Candidatus* Phytoplasma asteris' strains associated with oil palm lethal wilt in Colombia. **Plant Disease**, v. 98, p. 311-318, 2014.
- ALVAREZ, E.; MEJÍA, J. F.; LLANO, G. A.; LOKE, J. B.; CALARI, A.; DUDUK, B.; BERTACCINI, A. Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. **Plant Disease**, v. 93, p. 1139-1145, 2009.

ANDERSEN, M. T.; LIEFTING, L. W.; HAVUKKALA, I.; BEEVER, R. E. Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of '*Candidatus Phytoplasma australiense*' reveals genome plasticity. **BMC Genomics**, v. 14, p. 529, 2013.

ANGELINI, E.; CLAIR, D.; BORGIO, M.; BERTACCINI, A.; BOUDON-PADIEU, E. Flavescence dorée in France and Italy: occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. **Vitis**, v. 40, p. 79-86, 2001.

ARNAUD, G.; MALEMBIC-MAHER, S.; SALAR, P.; MAIXNER, M.; MARCONE, C.; BOUDON-PADIEU, E.; FOISSAC, X. Multilocus sequence typing confirms the close genetic inter-relatedness between three distinct Flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 4001-4010, 2007.

BAI, X.; ZHANG, J.; EWING, A.; MILLER, S. A.; RADEK, A. J.; SHEVCHENKO, D. V.; TSUKERMAN, K.; WALUNAS, T.; LAPIDUS, A.; CAMPBELL, J. W.; HOGENHOUT, S. A. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 3682-3696, 2006.

BARBARA, D. J.; MORTON, A.; CLARK, M. F.; DAVIES, D. L. Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. **Microbiology**, v. 148, p. 157-167, 2002.

BARIC, S.; DALLA-VIA, I. A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. **Journal of Microbiology Methods**, v. 57, p. 135-145, 2004.

BERG, M.; DAVIES, D. L.; CLARK, M. F.; VETTEN, J.; MAIER, G.; SEEMÜLLER, E. Isolation of a gene encoding an immunodominant membrane protein gene in the apple proliferation phytoplasma and expression and characterization of the gene product. **Microbiology**, v. 145, p. 1937-1943, 1999.

BERGES, R.; ROTT, M.; SEEMÜLLER, E. Range of phytoplasma concentration in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v. 90, p. 1145-1152, 2000.

BERTACCINI, A. **Phytoplasma collection**. Disponível em:
<<http://www.ipwgnnet.org/collection>>. Acesso em: 29 nov. 2015.

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

BERTACCINI, A.; BELLARDI, M. G.; VIBIO, M. Virus diseases of ornamental shrubs. X. *Euphorbia pulcherrima* Willd. infected by viruses and phytoplasmas. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 35, p. 129-132, 1996.

BERTACCINI, A.; DAVIS, R. E.; LEE, I.-M. *In vitro* micropropagation for maintenance of mycoplasma-like organisms in infected plant tissues. **HortScience**, v. 27, p. 1041-1043,

1992.

BERTACCINI, A.; DUDUK, B.; PALTRINIERI, S.; CONTALDO, N. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 1763-1788, 2014.

BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; STEFANI, E. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy). **Phytopathologia Mediterranea**, v. 34, p. 137-141, 1995.

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

BERTAMINI, M.; NEDUNCHEZHIAN, N.; TOMASI, F.; GRANDO, M. S. Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 357-366, 2002.

BLOMQUIST, C. L.; BARBARA, D. J.; DAVIES, D. L.; CLARK, M. F.; KIRKPATRICK, B. C. An immunodominant membrane protein gene from the western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. **Microbiology**, v. 147, p. 571-580, 2001.

BOTTI, S.; BERTACCINI, A. Grapevine yellows in northern Italy: molecular identification of Flavescence dorée phytoplasma strains and of Bois noir phytoplasmas. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2325-2330, 2007.

BOTTI, S.; BERTACCINI, A. Phytoplasma infection through seed transmission: further observations. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF MYCOPLASMOLOGY CONGRESS, 16., 2006, Cambridge. **Proceedings... Cambridge**: St. John's College, 2006.

CALARI, A.; PALTRINIERI, S.; CONTALDO, N.; SAKALIEVA, D.; MORI, N.; DUDUK, B.; BERTACCINI, A. Molecular evidence of phytoplasmas in winter oilseed rape, tomato and corn seedlings. **Bulletin of Insectology**, v. 64, p. S157-S158, 2011. Supplement.

CARGINALE, V.; MARIA, G.; CAPASSO, C.; IONATA, E.; LA CARA, F.; PASTORE, M.; BERTACCINI, A.; CAPASSO, A. Identification of genes expressed in response to phytoplasmal infection in leaves of *Prunus armeniaca* L. by messenger RNA differential display. **Gene**, v. 12, p. 29-34, 2004.

CARRARO, L.; LOI, N.; ERMACORA, P.; OSLER, R. High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 141-145, 1998.

CHEN, J.; PU, X.; DENG, X.; LIU, S.; LI, H.; CIVEROLO, E. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16SrIX) is associated with citrus

huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v. 98, p. 977-984, 2008.

CHEN, K. H.; REDI, R. C.; LOI, N.; MAIXNER, M.; CHEN, T. A. Identification and grouping of mycoplasma-like organisms associated with grapevine yellows and clover phyllody diseases based on immunological and molecular analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1905-1913, 1994.

CHRISTENSEN, N. M.; NICOLAISEN, M.; HANSEN, M.; SCHULTZ, A. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real time PCR and bioimaging. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 1175-1184, 2004.

CHUNG, B. N.; JEONG, M. I. Identification of "stolbur" phytoplasmas in *Petunia hybrida* seedlings. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 4, p. 5-8, 2014.

CIMERMAN, A.; PACIFICO, D.; SALAR, P.; MARZACHÌ, C.; FOISSAC, X. Striking diversity of vmp1, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2951-2957, 2009.

CLARK, M. F.; MORTON, A.; BUSS, S. L. Preparation of MLO immunogens from plants and a comparison of polyclonal and monoclonal antibodies made against primula yellows MLO-associated anti-gens. **Annals of Applied Biology**, v. 114, p. 111-124, 1989.

CONTALDO, N.; BERTACCINI, A.; PALTRINIERI, S.; WINDSOR, H. M.; WINDSOR, G. D. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 51, p. 607-617, 2012.

CONTALDO, N.; PALTRINIERI, S.; MAKAROVA, O.; BERTACCINI, A.; NICOLAISEN, M. Q-bank phytoplasma: a DNA bar-coding tool for phytoplasma identification. **Plant Pathology**, v. 302, p. 123-135, 2015.

CONTALDO, N.; SATTA, E.; BERTACCINI, A.; WINDSOR, G. D. Methods for **isolation by culture, and** subsequent molecular identification, of phytoplasmas from plants sourced in the field. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF MYCOPLASMOLOGY CONGRESS, 20., 2014, Blumenau. **Programme and abstracts**. Blumenau: **Universidade Regional de Blumenau**, 2014.

DAVIS, R. E.; DALLY, E. L.; GUNDERSEN, D. E.; LEE, I.-M.; HABILI, N. 'Candidatus phytoplasma australiense', a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 262-269, 1997.

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

DUDUK, B.; BERTACCINI, A. Corn with symptoms of reddening: new host of stolbur phytoplasma. **Plant Disease**, v. 90, p. 1313-1319, 2006.

- DUDUK, B.; BERTACCINI, A. Phytoplasma classification: taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 1, p. 1-13, 2011.
- DUDUK, B.; PALTRINIERI, S.; LEE, I.-M.; BERTACCINI, A. Nested PCR and RFLP analysis based on the 16S rRNA gene. **Methods in Molecular Biology**, v. 938, p. 159-171, 2013.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.
- FOS, A.; DANET, J. L.; ZREIK, L.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. **Plant Disease**, v. 76, p. 1092-1096, 1992.
- GALETTO, L.; BOSCO, D.; BALESTRINI, R.; GENRE, A.; FLETCHER, J.; MARZACHÌ, C. The major antigenic membrane protein of '*Candidatus Phytoplasma asteris*' selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper vectors. **PLoS One**, v. 6, p. e22571, 2011.
- GARCIA-CHAPA, M.; MEDINA, V.; VIRUEL, M. A.; LAVINA, A.; BATTLE, A. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. **Plant Pathology**, v. 52, p. 513-520, 2003.
- HANBOONSONG, Y.; CHOOSAI, C.; PANYIM, S.; DAMAK, S. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). **Insect Molecular Biology**, v. 11, p. 97-103, 2002.
- HODGETTS, H.; BOONHAM, N.; MUMFORD, R.; HARRISON, N.; DICKINSON, M. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of '*Candidatus Phytoplasma*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1826-1837, 2008.
- HOGENHOUT, S. A.; OSHIMA, K.; AMMAR, E.-D.; KAKIZAWA, S.; KINGDOM, H. N.; NAMBA, S. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, p. 403-423, 2008.
- HOSHI, A.; OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; ISHII, Y.; OZEKI, J.; HASHIMOTO, M.; KOMATSU, K.; KAGIWADA, S.; YAMAJI, Y.; NAMBA, S. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 6416-6421, 2009.
- HREN, I. M.; RAVNIKAR, M.; BRZIN, J.; ERMACORA, P.; CARRARO, L.; BIANCO, P. A.; CASATI, P.; BORGIO, M.; ANGELINI, E.; ROTTER, A.; GRUDEN, K. Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. **Plant Pathology**, v. 58, p. 170-180, 2009.
- IRPCM. '*Candidatus Phytoplasma*', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1243-1255, 2004.

ISHII, Y.; KAKIZAWA, S.; HOSHI, A.; MAEJIMA, K.; KAGIWADA, S.; YAMAJI, Y.; OSHIMA, K.; NAMBA, S. In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. **Microbiology**, v. 155, p. 2058-2067, 2009.

ISHIIE, T.; DOI, Y.; YORA, K.; ASUYAMA, H. Suppressing effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. **Annals of Phytopathological Society Japan**, v. 33, p. 267-275, 1967.

JAGOUÉIX-EVEILLARD, S.; TARENDAU, F.; GUOLTER, K.; DANET, J. L.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 225-233, 2001.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R. E. Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, p. 59-65, 2006.

JUNQUEIRA, A.; BEDENDO, I.; PASCHOLATI, S. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasmas. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, p. 181-185, 2004.

KAKIZAWA, S.; OSHIMA, K.; ISHII, Y.; HOSHI, A.; MAEJIMA, K.; JUNG, H.-Y.; YAMAJI, Y.; NAMBA, S. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. **FEMS Microbiology Letters**, v. 293, p. 91-101, 2009.

KAKIZAWA, S.; OSHIMA, K.; KUBOYAMA, T.; NISHIGAWA, H.; JUNG, H.-Y.; SAWAYANAGI, T.; TSUCHIZAKI, T.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; NAMBA, S. Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 1043-1050, 2001.

KAKIZAWA, S.; OSHIMA, K.; NISHIGAWA, H.; JUNG, H.-Y.; WEI, W.; SUZUKI, S.; TANAKA, M.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; NAMBA, S. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 150, p. 135-142, 2004.

KAWAKITA, H.; SAIKI, T.; WEI, W.; MITSUHASHI, W.; WATANABE, K.; SATO, M. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. **Phytopathology**, v. 90, p. 909-914, 2000.

KHAN, A. J.; BOTTI, S.; PALTRINIERI, S.; AL-SUBHI, A. M.; BERTACCINI, A. Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF MYCOPLASMOLOGY CONGRESS, 14., 2002, Vienna. **Abstracts...** Vienna: [s. n.], 2002.

KUBE, M.; MITROVIC, J.; DUDUK, B.; RABUS, R.; SEEMÜLLER, E. Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-25, 2012. DOI: 10.1100/2012/185942.

KUBE, M.; SCHNEIDER, B.; KUHL, H.; DANDEKAR, T.; HEITMANN, K.; MIGDO, A. M.; REINHARDT, R.; SEEMÜLLER, E. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. **BMC Genomics**, v. 9, p. 306, 2008.

KUBOYAMA, T.; HUANG, C.; LU, X.; SAWAYANAGI, T.; KANAZAWA, T.; KAGAMI, T.; MATSUDA, I.; TSUCHIZAKI, T.; NAMBA, S. A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic phytoplasma mutant. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 11, p. 1031-1037, 1998.

LANGER, M.; MAIXNER, M. Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. **Vitis**, v. 43, p. 191-199, 2004.

LEE, I.-M.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; GUNDERSEN, D. E. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. **Phytopathology**, v. 85, p. 728-735, 1995.

LEE, I.-M.; BOTTFNER-PARKER, K. D.; ZHAO, Y.; BERTACCINI, A.; DAVIS, R. E. Differentiation and classification of phytoplasmas in the pigeon pea witches' broom group (16SrIX): an update based on multiple gene sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2279-2285, 2012.

LEE, I.-M.; BOTTFNER-PARKER, K. D.; ZHAO, Y.; DAVIS, R. E.; HARRISON, N. A. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2887-2897, 2010.

LEE, I.-M.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 1593-1597, 2000.

LEE, I.-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; BERTACCINI, A. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. **Phytopathology**, v. 88, p. 1359-1366, 1998a.

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

LEE, I.-M.; KLOPMEYER, M.; BARTOSZYK, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; CHOU, T.; THOMSON, K. L.; EISENREICH, R. Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 178-182, 1997.

LEE, I.-M.; MARTINI, M.; BOTTFNER, K. D.; DANE, R. A.; BLACK, M. C.; TROXCLAIR, N. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. **Phytopathology**, v. 93, p. 1368-1377, 2003.

LEE, I.-M.; ZHAO, Y.; BOTTFNER, K. D. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. **Molecular and Cellular Probes**, v. 20, p. 87-91, 2006.

LEPKA, P.; ATITT, M.; MOLL, E.; SEEMÜLLER, E. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 59-68, 1999.

MACLEAN, A. M.; SUGIO, A.; MAKAROVA, O. V.; FINDLAY, K. C.; GRIEVE, V. M.; TOTH, R.; NICOLAISEN, M.; HOGENHOUT, S. Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. **Plant Physiology**, v. 157, p. 831-841, 2011.

MAKAROVA, O. V.; CONTALDO, N.; PALTRINIERI, S.; KAWUBE, G.; BERTACCINI, A.; NICOLAISEN, M. DNA barcoding for universal identification of '*Candidatus* Phytoplasmas' using a fragment of the elongation factor Tu gene. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52092, 2012.

MARTINI, M.; BOTTI, S.; MARCONE, C.; MARZACHÌ, C.; CASATI, P.; BIANCO, P. A.; BENEDETTI, R.; BERTACCINI, A. Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, p. 197-208, 2002.

MARTINI, M.; LEE, I.-M.; BOTTLNER, K. D.; ZHAO, Y.; BOTTI, S.; BERTACCINI, A.; HARRISON, N. A.; CARRARO, L.; MARCONE, C.; KHAN, J.; OSLER, R. Ribosomal protein gene-based filogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2037-2051, 2007.

MARTINI, M.; MURARI, E.; MORI, N.; BERTACCINI, A. Identification and epidemic distribution of two Flavescence dorée-related phytoplasmas in Veneto (Italy). **Plant Disease**, v. 83, p. 925-930, 1999.

MARZACHÌ, C.; BOSCO, D. Relative quantification of chrysanthemum yellows (16Sr I) phytoplasma in its plant and insect host using real-time polymerase chain reaction. **Molecular Biotechnology**, v. 30, p. 117-128, 2005.

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

MITROVIC, J.; KAKIZAWA, S.; DUDUK, B.; OSHIMA, K.; NAMBA, S.; BERTACCINI, A. The cpn60 gene as an additional marker for finer differentiation of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' related strains. **Annals of Applied Biology**, v. 159, p. 41-48, 2011.

MITROVIC, J.; SMILJKOVIĆ, M.; SEEMÜLLER, E.; REINHARDT, R.; HÜTTEL, B.; BÜTTNER, C.; BERTACCINI, A.; KUBE, M.; DUDUK, B. Differentiation of '*Candidatus* Phytoplasma cynodontis' based on 16S rRNA and *groEL* genes and identification of a new subgroup, 16SrXIV-C. **Plant Disease**, v. 99, n. 11, p. 1578-1583, 2015. DOI: 10.1094/PDIS-01-15-0061-RE.

MOLINO LOVA, M.; QUAGLINO, F.; ABOU-JAWDAH, Y.; CHOUËIRI, E.; SOBH, H.; CASATI, P.; TEDESCHI, R.; ALMA, A.; BIANCO, P. A. Identification of new 16SrIX subgroups, -F and -G, among '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium' strains infecting

almond, peach and nectarine in Lebanon. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, p. 273-282, 2011.

MORI, N.; MITROVIĆ, J.; SMILJKOVIĆ, M.; DUDUK, N.; PALTRINIERI, S.; BERTACCINI, A.; DUDUK, B. *Hyalesthes obsoletus* in Serbia and its role in the epidemiology of corn reddening. **Bulletin of Insectology**, v. 66, p. 245-250, 2013.

MORTON, A.; DAVIES, D. L.; BLOMQUIST, C. L.; BARBARA, D. J. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 109-114, 2003.

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

NERIYA, Y.; MAEJIMA, K.; NIJO, T.; TOMOMITSU, T.; YUSA, A.; HIMENO, M.; NETSU, O.; HAMAMOTO, H.; OSHIMA, K.; NAMBA, S. Onion yellow phytoplasma P38 protein plays a role in adhesion to the hosts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 361, p. 115-122, 2014.

NISHIGAWA, H.; MIYATA, S.; OSHIMA, K.; SAWAYANAGI, T.; KOMOTO, A.; KUBOYAMA, A.; MATSUDA, I.; TSUCHIZAKI, T.; NAMBA, S. *In planta* expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. **Microbiology**, v. 147, p. 507- 513, 2001.

NISHIGAWA, H.; OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; JUNG, H.; KUBOYAMA, T.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; NAMBA, A. Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma. **Microbiology**, v. 148, p. 1389-1396, 2002.

OSHIMA, K.; ISHII, Y.; KAKIZAWA, S.; SUGAWARA, K.; NERIYA, Y.; HIMENO, M.; MINATO, N.; MIURA, C.; SHIRAIISHI, T.; YAMAJI, Y.; NAMBA, S. Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. **PLoS One**, v. 6, p. e23242, 2011.

OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; ARASHIDA, R.; ISHII, Y.; HOSHI, A.; HAYASHI, Y.; KAWAGIDA, S.; NAMBA, S. Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of '*Candidatus* Phytoplasma asteris'. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 481-489, 2007.

OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; JUNG, H.-Y.; WEI, W.; SUZUKI, S.; ARASHIDA, R.; NAKATA, D.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; NAMBA, S. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. **Nature Genetics**, v. 36, p. 27-29, 2004.

OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; KUBOYAMA, T.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; NAMBA, A. A plasmid of phytoplasma encodes a unique replication protein having both plasmid and virus-like domains: *clue* to viral ancestry or result of virus/plasmid recombination. **Virology**, v. 285, p. 270-277, 2001a.

OSHIMA, K.; SHIOMI, T.; KUBOYAMA, T.; SAWAYANAGI, T.; NISHIGAWA, H.; NAMBA, A. Isolation and characterization of derivative lines of the onion yellows phytoplasma that do not cause stunting or phloem hyperplasia. **Phytopathology**, v. 91, p. 1024-1029, 2001b.

PADOVAN, A. C.; GIBB, K. S.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; BONFIGLIOLI, R. E.; MAGAREY, P. A.; SEARS, B. B. Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with a grapevine yellows phytoplasma from Emilia-Romagna in Italy. **Australian Journal of Grape and wine Research**, v. 1, p. 25-31, 1995.

PALERMO, S.; ELEKES, M.; BOTTI, S.; EMBER, I.; ALMA, A.; OROSZ, A.; BERTACCINI, A.; KÖLBER, M. Presence of Stolbur phytoplasma in Cixiidae from Hungarian grapevine growing areas. **Vitis**, v. 43, p. 201-203, 2004.

PRACROS, P.; RENAUDIN, J.; EVEILLARD, S.; MOURAS A.; HERNOULD, M. Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v. 19, p. 62-68, 2006.

QUAGLINO, F.; KUBE, M.; JAWHARI, M.; ABOUT-JAWDAH, Y.; SIEWERT, C.; CHOUERI, E.; SOBH, H.; CASATI, P.; TEDESCHI, R.; MOLINO LOVA, M.; ALMA, A.; BIANCO, P. A. '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium' associated with almond witches' broom disease: from draft genome to genetic diversity among strain populations. **BMC Microbiology**, v. 15, p. 148, 2015.

REKAB, D.; CARRARO, L.; SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E.; CHEN, J.; CHANG, C. J.; LOCCI, R.; FIRRAO, G. Geminivirus-related extrachromosomal DNAs of the X-clade phytoplasmas share high sequence similarity. **Microbiology**, v. 145, p. 1453-1459, 1999.

SAFAROVA, D.; ZEMANEK, T.; VALOVA, P.; NAVRATIL, M. '*Candidatus* Phytoplasma cirsii', a novel taxon from creeping thistle [*Cirsium arvense* (L.) Scop.]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 66, p. 1745-1753, 2016.

SAIGO, M.; GOLIC, A.; ALVAREZ, C. E.; ANDREO, C. S.; HOGENHOUT, S. A.; MUSSI, M. A.; DRINCOVICH, M. F. Metabolic regulation of phytoplasma malic enzyme and phosphotransacetylase supports the use of malate as an energy source in these plant pathogens. **Microbiology**, v. 160, p. 2794-2806, 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SCHNEIDER, B.; GIBB, K. S.; SEEMÜLLER, E. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. **Microbiology**, v. 143, p. 3381-3389, 1997.

SEARS, B. B.; KLOMPARENS, K. L.; WOOD, J. I.; SCHEWE, G. Effect of altered levels of oxygen and carbon dioxide on phytoplasma abundance in *Oenothera* leaf tip cultures. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, p. 275-287, 1997.

SEEMÜLLER, E.; KISS, E.; SULE, S.; SCHNEIDER, B. Multiple infection of apple trees by distinct strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*' and its pathological relevance. **Phytopathology**, v. 100, p. 863-870, 2010.

SEEMÜLLER, E.; SCHNEIDER, B. Taxonomic description of '*Candidatus Phytoplasma mali*' sp. nov., '*Candidatus Phytoplasma pyri*' sp. nov. and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' sp. nov., the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1217-1226, 2004.

SIEWERT, C.; LUGE, T.; DUDUK, B.; SEEMÜLLER, E.; BÜTTNER, C.; SAUER, S.; KUBE, M. Analysis of expressed genes of the bacterium '*Candidatus Phytoplasma mali*' highlights key features of virulence and metabolism. **PLoS One**, v. 9, p. e94391, 2014.

SINCLAIR, W. A.; GRIFFITHS, H. M. Variation in aggressiveness of ash yellows phytoplasmas. **Plant Disease**, v. 84, p. 282-288, 2000.

SMART, C. D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C. L.; GUERRA, L. J.; HARRISON, N. A.; AHRENS, U.; LORENZ, K. H.; SEEMÜLLER, E.; KIRKPATRICK, B. C. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S rRNA spacer region. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2988-3033, 1996.

SUGIO, A.; KINGDOM, H. N.; MACLEAN, A. M.; GRIEVE, V. M.; HOGENHOUT, S. A. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. E1254-E1263, 2011.

SUZUKI, S.; OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; ARASHIDA, R.; JUNG, H.-Y.; YAMAJI, Y.; NISHIGAWA, H.; UGAKI, M.; NAMBA, S. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect vector specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 4252-4257, 2006.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 11030-11035, 2004.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TEDESCHI, R.; FERRATO, V.; ROSSI, J.; ALMA, A. Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. **Plant Pathology**, v. 55, p. 18-24, 2006.

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; MARTINS, E. C.; KITAJIMA, E. W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A. J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. A phytoplasma related to '*Candidatus Phytoplasma asteris*' detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. **Phytopathology**, v. 99, p. 236-242, 2009.

TORUNO, T. Y.; SERUGA MUSIĆ, M.; SIMI, S.; NICOLAISEN, M.; HOGENHOUT, S. A. Phytoplasma PMU1 Exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. **Molecular Microbiology**, v. 77, p. 1406-1415, 2010.

TRAN-NGUYEN, L. T.; KUBE, M.; SCHNEIDER, B.; REINHARDT, R.; GIBB, K. S. Comparative genome analysis of '*Candidatus* Phytoplasma australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and '*Ca. Phytoplasma asteris*' strains OY-M and AY-WB. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 3979-3991, 2008.

TYMON, A. M.; JONES, P.; HARRISON, N. A. Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of specific oligonucleotide PCR primers. **Annals of Applied Biology**, v. 132, p. 437-452, 1998.

VILLALOBOS, W.; MARTINI, M.; GARITA, L.; MUÑOZ, M.; OSLER, R.; MOREIRA, L. *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae), a new natural host of 16SrXV phytoplasma in Costa Rica. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 2, p. 110-115, 2011.

WEI, W.; DAVIS, R. E.; JOMANTIENE, R.; ZHAO, Y. Ancient, recurrent phage attacks and recombination shaped dynamic sequence-variable mosaics at the root of phytoplasma genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 11827-11832, 2008.

WEI, W.; DAVIS, R. E.; LEE, I.-M.; ZHAO, Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of **ten new phytoplasma groups**. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1855-1867, 2007.

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 **yellow** **phytoplasma using localized inoculation by insect transmission**. **Phytopathology**, v. 94, p. 244-250, 2004.

ZHAO, Y.; WEI, W.; LEE, I.-M.; SHAO, J.; SUO, X.; DAVIS, R. E. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2582-2593, 2009.

Literatura Recomendada

AL-SAADY, N. A.; KHAN, A. J.; CALARI, A.; AL-SUBHI, A. M.; BERTACCINI, A. '*Candidatus* Phytoplasma omanense', a phytoplasma associated with witches' broom of *Cassia italica* (Mill.) Lam. in Oman. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 461-466, 2008.

AROCHA, Y.; ANTESANA, O.; MONTELLANO, E.; FRANCO, P.; PLATA, G.; JONES, P. 'Candidatus Phytoplasma lycopersici', a phytoplasma associated with 'hoja de perejil' disease in Bolivia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1704-1710, 2007.

AROCHA, Y.; LOPEZ, M.; PINOL, B.; FERNANDEZ, M.; PICORNELL, B.; ALMEIDA, R.; PALENZUELA, I.; WILSON, M. R.; JONES, P. 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2451-2463, 2005.

DAVIS, R. E.; HARRISON, N. A.; ZHAO, Y.; WEI, W.; DALLY, E. L. 'Candidatus Phytoplasma hispanicum', a novel taxon associated with Mexican periwinkle virescence disease of *Catharanthus roseus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 3466-3467, 2016. DOI: 10.1099/ijsem.0.001218, 2016.

DAVIS, R. E.; ZHAO, Y.; DALLY, E. L.; JOMANTIENE, R.; LEE, I.-M.; WEI, W.; KITAJIMA, E. W. 'Candidatus Phytoplasma sudamericanum', a novel taxon, and strain PassWB-Br4, a new subgroup 16SrIII-V phytoplasma, from diseased passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 984-989, 2012.

DAVIS, R. E.; ZHAO, Y.; DALLY, E. L.; LEE, I.-M.; JOMANTIENE, R.; DOUGLAS, S. M. 'Candidatus Phytoplasma pruni', a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, secY, and ribosomal protein genes. **International Journal of Systematic**, v. 63, p. 766-776, 2013.

FERNÁNDEZ, F. D.; GALDEANO, E.; KORNOWSKI, M. V.; ARNEODO, J. D.; CONCI, L. R. Description of 'Candidatus Phytoplasma meliae', a phytoplasma associated with chinaberry (*Melia azedarach* L.) yellowing in South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Sept. 2016. DOI: 10.1099/ijsem.0.001503.

GRIFFITHS, H. M.; SINCLAIR, W. A.; SMART, C. D.; DAVIS, R. E. The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches' broom: 'Candidatus Phytoplasma fraxini'. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1605-1614, 1999.

HARRISON, N.; DAVIS, R. E.; OROPEZA, C.; HELMICK, E.; NARVAEZ, M.; EDEN-GREEN, S.; DOLLET, M.; DICKINSON, M. 'Candidatus Phytoplasma palmicola', a novel taxon associated with a lethal yellowing-type disease (LYD) of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1890-1899, 2014.

HIRUKI, C.; WANG, K. R. Clover proliferation phytoplasma: 'Candidatus Phytoplasma trifolii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1349-1353, 2004.

JUNG, H.-Y.; SAWAYANAGI, T.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; MIYATA, S.; OSHIMA, K.; UGAKI, M.; JOON-TAK, L.; NAMBA, S. 'Candidatus Phytoplasma castaneae', a novel

phytoplasma taxon associated with chestnut witches' broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1543-1549, 2002.

JUNG, H.-Y.; SAWAYANAGI, T.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; WEI, W.; OSHIMA, K.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; HIBI, T.; NAMBA, S. '*Candidatus* Phytoplasma ziziphi', a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches' broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1037-1041, 2003.

JUNG, H.-Y.; SAWAYANAGI, T.; WONGKAEW, P.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; WEI, W.; OSHIMA, K.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; HIBI, T.; NAMBA, S. '*Candidatus* Phytoplasma oryzae', a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1925-1929, 2003.

LEE, I.-M.; BOTTLNER, K. D.; SECOR, G.; RIVERA-VARAS, V. '*Candidatus* Phytoplasma americanum' a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1593-1597, 2006.

LEE, I.-M.; BOTTLNER-PARKER, K. D.; ZHAO, Y.; VILLALOBOS, W.; MOREIRA, L. '*Candidatus* Phytoplasma costaricanum' a new phytoplasma associated with a newly emerging disease in soybean in Costa Rica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2822-2826, 2011.

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

LEE, I.-M.; MARTINI, M.; MARCONE, C.; ZHU, S. F. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus* Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 337-347, 2004.

MALEMBIC-MAHER, S.; SALAR, P.; FILIPPIN, L.; CARLE, P.; ANGELINI, E.; FOISSAC, X. Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of '*Candidatus* Phytoplasma rubi'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2129-2134, 2011.

MARCONE, C.; GIBB, K. G.; STRETEN, C.; SCHNEIDER, B. '*Candidatus* Phytoplasma spartii', '*Candidatus* Phytoplasma rhamni' and '*Candidatus* Phytoplasma allocasuarinae', respectively associated with spartium witches' broom, buckthorn witches' broom and allocasuarina yellows diseases. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1025-1029, 2003.

MARCONE, C.; SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E. '*Candidatus* Phytoplasma cynodontis', the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1077-1082, 2003.

MARTINI, M.; MARCONE, C.; MITROVIĆ, J.; MAIXNER, M.; DELIĆ, D.; MYRTA, A.; ERMACORA, P.; BERTACCINI, A.; DUDUK, B. '*Candidatus Phytoplasma convolvuli*', a new phytoplasma taxon associated with bindweed yellows in four European countries. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2910-2915, 2012.

MONTANO, H. G.; DAVIS, R. E.; DALLY, E. L.; HOGENHOUT, S.; PIMENTEL, P. P.; BRIOSO, P. S. T. '*Candidatus Phytoplasma brasiliense*', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1109-1118, 2001.

NEJAT, N.; VADAMALAI, G.; DAVIS, R. E.; HARRISON, N. A.; SIJAM, K.; DICKINSON, M.; ABDULLAH, S. N.; ZHAO, Y. '*Candidatus Phytoplasma malaysianum*', a novel taxon associated with virescence and phyllody of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 540-548, 2012.

QUAGLINO, F.; ZHAO, Y.; CASATI, P.; BULGARI, D.; BIANCO, P. A.; WEI, W.; DAVIS, R. E. '*Candidatus Phytoplasma solani*', a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 2879-2894, 2013.

SAWAYANAGI, T.; HORIKOSHI, N.; KANEHIRA, T.; SHINOHARA, M.; BERTACCINI, A.; COUSIN, M. T.; HIRUKI, C.; NAMBA, S. '*Candidatus Phytoplasma japonicum*', a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1275-1285, 1999.

SCHNEIDER, B.; TORRES, E.; MARTÍN, M. P.; SCHRODER, M.; BEHNKE, H. D.; SEEMÜLLER, E. '*Candidatus Phytoplasma pini*', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 303-307, 2005.

VALIUNAS, D.; STANIULIS, J.; DAVIS, R. E. '*Candidatus Phytoplasma fragariae*', a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria x ananassa*. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 277-281, 2006.

VERDIN, E.; SALAR, P.; DANET, J.-L.; CHOUEIRI, E.; JREIJIRI, F.; EL ZAMMAR, S.; GÈLIE, B.; BOVÉ, J.; GARNIER, M. '*Candidatus Phytoplasma phoeniceum*', a new phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 833-838, 2003.

WHITE, D. T.; BLACKALL, L. L.; SCOTT, P. T.; WALSH, K. B. Phylogenetic positions of phytoplasmas associated with dieback, yellow crinkle and mosaic diseases of papaya, and their proposed inclusion in '*Candidatus Phytoplasma australiense*' and a new taxon, '*Candidatus Phytoplasma australasia*'. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 941-951, 1998.

WIN, N. K. K.; LEE, S.-Y.; BERTACCINI, A.; NAMBA, S.; JUNG, H.-Y. '*Candidatus Phytoplasma balanitae*' associated with witches' broom disease of *Balanites triflora*.

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 63,p. 636-640, 2013.

ZHAO, Y.; SUN, Q.; WEI, W.; DAVIS, R. E.; WU, W.; LIU, Q. 'Candidatus Phytoplasma tamaricis', a novel taxon discovered in witches' broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2496-2504, 2009.

ZREIK, L.; CARLE, P.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a 'Candidatus' taxon for the organism, 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45,p. 449-453, 1995.

Capítulo 4

Metabolismo, fisiologia e variabilidade genética de espiroplasmas, com ênfase em *Spiroplasma kunkelii*

*Eliane Aparecida Gomes | Ana Luiza Castanheira | Isabel Regina
Prazeres de Souza*



Introdução

Os enfezamentos pálido (*corn stunt* – CS) e vermelho (*maize bushy stunt* – MBS), causados, respectivamente, por espiroplasma e fitoplasma, são doenças de importância econômica na cultura do

milho, com ocorrência no Brasil e demais países da América do Sul, além do México e dos Estados Unidos. Os sintomas dessas doenças caracterizam-se por clorose do cartucho das plântulas, avermelhamento ou amarelecimento das folhas das plantas adultas, encurtamento de internódios e proliferação de espigas pequenas (OLIVEIRA et al., 2013).

CS e MBS são causados, respectivamente, por *Spiroplasma kunkelii* (CHEN; LIAO, 1975; WILLIAMSON; WHITCOMB, 1975) e *maize bushy stunt phytoplasma*, membro do subgrupo aster yellow 16Srl-B (LEE et al., 2004). Ambos são microrganismos procariotos da classe Mollicutes, Filo Tenericutes, gram-positivos, unicelulares, sem parede celular, tamanho pequeno (1 μ M a 2 μ M de diâmetro) e genoma na faixa de 530 kb a 2.220 kb, que se multiplicam na seiva do floema e dependem de insetos-vetores para sua propagação. A cigarrinha *Dalbulus maidis* é o principal inseto-vetor desses patógenos (LEGRAND; POWER, 1994; MOYA-RAYGOZA; NAULT, 1998; OLIVEIRA et al., 2015). CS e MBS tornam-se ainda mais relevantes por apresentarem as mesmas plantas-hospedeiras e insetos-vetores, o que pode contribuir para interações sinérgicas entre estes patógenos.

Entre as principais diferenças entre estes microrganismos, destacam-se a capacidade de crescimento dos espiroplasmas em meio de cultura rico, sua mobilidade e morfologia helicoidal característica, enquanto os fitoplasmas exibem a forma pleiotrófica ou filamentosa e são mais recalcitrantes ao cultivo, apesar de relatos recentes de cultivo destes em meios de cultura disponíveis comercialmente (BERTACCINI et al., 2010, 2014; CONTALDO et al., 2012).

Apenas três espécies de espiroplasma são fitopatogênicas: *S. kunkelii*, que infecta o milho; *S. citri*, que infecta citros e *S. phoenicium*, que infecta vinca (*Catharanthus roseus*) (GASPARICH, 2010). Esses espiroplasmas são adquiridos por insetos-vetores específicos, através da alimentação em plantas infectadas. Para serem transmitidos para outras plantas, multiplicam-se no intestino médio dos insetos-vetores, migram para a hemolinfa e, subsequentemente, infectam as glândulas salivares, onde se misturam com a saliva, e são injetados nas plantas quando os insetos se alimentam no floema. Nenhum efeito patológico é associado com a multiplicação desses espiroplasmas no inseto-hospedeiro, onde são considerados microrganismos comensais (GASPARICH, 2010) e um inseto infectado poderá servir como vetor de transmissão durante todo o seu ciclo de vida. Nas plantas, multiplicam-se no floema, infectando sistemicamente todos os tecidos delas.

Apesar do impacto significativo na agricultura, pouco é conhecido sobre os mecanismos biológicos fundamentais e de patogenicidade dos espiroplasmas.

Aspectos do genoma dos espiroplasmas

Apesar das dificuldades, como a presença de sequências repetitivas de bacteriófagos que dificultam a montagem do genoma, os projetos de sequenciamento de espiroplasmas já elucidaram importantes questões sobre metabolismo, patogenicidade e dinâmica do genoma. Em 2002, foi finalizado o sequenciamento de alta qualidade de quase 150 mil nucleotídeos não redundantes de *S.*

kunkelii (BAI; HOGENHOUT, 2002); em 2003, foi sequenciado um fragmento de 85 kb do genoma de *S. kunkelii* (ZHAO et al., 2003) e em 2010 foi publicado o rascunho do genoma (sequência do genoma ainda não completamente finalizada) de *S. citri* (CARLE et al., 2010). Os resultados mostram que o genoma de *S. kunkelii*, comparado aos outros mollicutes já sequenciados, apresenta um maior número de genes que participam da biossíntese de purinas e aminoácidos, regulação de transcrição, genes de transporte e ligação ao envelope celular e ao DNA, e um arranjo único de genes do operon de proteínas ribossômicas (ZHAO et al., 2003). Além disso, um estudo comparativo dentro do mollicutes mostrou várias proteínas que são compartilhadas entre *S. kunkelii* e os fitoplasmas, mas estão ausentes nos patógenos de animais como *Mycoplasma* e *Ureaplasma* spp. (BAI et al., 2004).

Com esses resultados, um quadro geral dos fatores envolvidos na patogenicidade começa a emergir. Por exemplo, uma característica marcante do genoma dos espiroplasmas é a presença de sequências de DNA de plectovírus (bacteriófagos que infectam exclusivamente bactérias sem parede celular) distribuídas por todo o genoma (BOLAÑOS et al., 2015). A presença de sequências de plectovírus foi detectada desde o primeiro relato da sequência genômica de 85 kb de *S. kunkelii*, por Zhao et al. (2003). Genes de patogenicidade foram adquiridos, provavelmente, por transferência horizontal mediada por vírus, existindo uma correlação entre a infecção viral e a patogenicidade dos espiroplasmas (KU et al., 2013). A plasticidade do genoma pode se originar de constantes aquisições e perdas de sequências de DNA, sob forte pressão seletiva (HERREN; LEMAITRE, 2011).

Outros estudos mostraram que, embora a mobilidade seja uma característica comum aos espiroplasmas, mutantes de *S. citri* que não a apresentam também são transmitidos, via inseto-vetor, para plantas hospedeiras, resultando em sintomas semelhantes àqueles causados pelos parentais selvagens (DURET et al., 1999). Ao contrário, os genes Sc76, relativos a transportadores do tipo ABC (responsáveis pelo transporte ativo de substâncias secretadas ou absorvidas) e genes que codificam a proteína de membrana espiralina, parecem estar envolvidos na transmissão via inseto-vetor (ver tópico abaixo). Experimentos de inativação de Sc76 resultaram em decréscimo no número de espiroplasmas transmitidos pelo vetor (BOUTAREAUD et al., 2004), enquanto um mutante deficiente em espiralina também apresentou um decréscimo na transmissão do inseto para a planta-hospedeira (DURET et al., 2003). A proteína de membrana relacionada à adesão SARP1 (*adhesion-related protein*) também parece estar envolvida na adesão de *S. citri* à membrana do intestino médio do inseto-vetor (YU et al., 2000).

Outros aspectos biológicos ainda precisam ser elucidados, principalmente genes envolvidos nas funções de patogenicidade. As proteínas hipotéticas contribuem com, aproximadamente, 40% do total de genes codantes, e a maioria dos genes espécie-específicos foram anotados como hipotéticos nas comparações de genomas. Estes genes espécie-específicos provavelmente são os elementos mais importantes para o entendimento da associação que os espiroplasmas estabelecem com seus hospedeiros (BOLAÑOS et al., 2015). Espera-se que avanços nos processos de sequenciamento, associados à proteômica e metabolômica, possam contribuir para a identificação de genes-candidatos, relacionados à interação espiroplasma-hospedeiro, e para o entendimento da

dinâmica da expressão gênica e das proteínas, na presença do hospedeiro. Outro aspecto de extrema importância é a criação de bancos de mutantes, para auxiliar na elucidação das funções de novos, hipotéticos ou desconhecidos genes anotados de espiroplasmas.

Aspectos do metabolismo dos espiroplasmas

Espiroplasmas são microrganismos anaeróbios facultativos e se reproduzem por fissão binária, com tempo de geração de 0,7 horas a 36,7 horas (WILLIAMSON et al., 1998). Apresentam limitadas capacidades biossintéticas e são considerados organismos fastidiosos em razão dos complexos requerimentos nutricionais para seu cultivo *in vitro*.

São quimio-organotróficos, e apresentam características bioquímicas como fermentação de glicose e hidrólise de arginina, mas não hidrolisam ureia. A maioria de todos os genes necessários para síntese de aminoácidos estão ausentes nesses microrganismos (KONAI et al., 1996; GASPARICH, 2002). O principal mecanismo de aquisição de aminoácidos do meio é o sistema de transporte de oligopeptídeos, que é conservado em todos os genomas de espiroplasmas sequenciados (*oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF*). Outras permeases importantes conservadas são aquelas para o transporte de glicose (*ptsG*) e de frutose (*fruA*). Além dos transportadores, apresentam um completo conjunto de genes envolvidos na glicólise. *S. kunkelii* promove fermentação dos açúcares presentes no meio de cultura ou nas plantas que infecta, o que deve ser seu principal mecanismo de produção de energia. A

fermentação leva à produção de ácidos e, em meios de cultura não tamponados, a diminuição do pH do meio torna-o desfavorável para o seu crescimento. Nos insetos, eles crescem em trealose, a principal fonte de açúcar e de carbono na hemolinfa e então trocam para glicose e frutose nos tubos crivados do floema da planta. Desse modo, é necessária uma rápida adaptação entre diferentes fontes de energia, o que é possível pela presença de um único domínio IIA nas permeases da trealose e da glicose do sistema PTS de espiroplasmas. TreB é um transportador envolvido na absorção de trealose e TreA é a enzima que converte trealose 6-P em glicose 6-P (GASPARICH, 2010).

Os fitoplasmas e espiroplasmas são microrganismos endógenos, ou seja, são introduzidos pelos insetos-vetores e vivem restritos ao floema onde eles encontram os nutrientes necessários para seu metabolismo. Os mecanismos pelos quais os espiroplasmas causam efeitos negativos nas plantas ainda não são bem conhecidos, e provavelmente são oriundos de interferências nos mecanismos moleculares da planta. Estudos em *Spiroplasma citri*, que é considerado um organismo modelo para investigar os efeitos dos mollicutes fitopatógenos às plantas, propõem o acúmulo de toxinas e ácido láctico como um dos mecanismos de desenvolvimento da doença (DANIELS, 1983). *S. citri* também leva a uma diminuição da produção de auxinas, e foi proposto que a utilização de esteroides da planta pode resultar em uma deficiência dos reguladores de crescimento (CHANG, 1998). No entanto, nenhum experimento conclusivo pôde confirmar estas hipóteses.

Outros trabalhos mostraram o papel do metabolismo dos carboidratos na patogenicidade dos espiroplasmas (GAURIVAUD et al., 2000a, 2000b, 2001; ANDRÉ et al., 2003, 2005). Os primeiros

estudos observaram que mutantes de *S. citri* incapazes de utilizar frutose (mutantes GMT 553) eram incapazes de causarem patogenicidade nas plantas, enquanto mutações que impediam a utilização de glicose em mutantes *ptsG* GII3-glc1 induziram sintomas severos, tais como amarelecimento das folhas, diminuição dos internódios e redução do crescimento das plantas infectadas, semelhantes aos causados pelo tipo selvagem GII-3, exceto que os sintomas apareceram uma semana depois (ANDRÉ et al., 2005). Nos mutantes GMT 553, conhecidos como “não patogênicos”, a mutação ocorreu na permease do sistema de fosfoenolpiruvato/fosfotransferase de frutose (sistema PTS da frutose, gene *fruA*), indicando ser este o principal sistema de importação de carboidratos em *S. citri*. O atraso no aparecimento dos sintomas é consistente com o fato de que a transmissão do mutante GII3-glc1 pela cigarrinha foi menos eficiente do que a transmissão do tipo selvagem GII-3. Isso ocorreu porque, no inseto-vetor, quando *S. citri* se move da hemolinfa para as glândulas salivares, ocorre uma rápida adaptação às diferentes fontes de energia: trealose na hemolinfa e glicose nas glândulas salivares. A dificuldade de usar glicose do mutante GII3-glc1 pode ter reduzido a multiplicação dos espiroplasmas na glândula salivar, resultando em menor eficiência de transmissão pelo inseto-vetor. A complementação funcional dos mutantes com genes do tipo selvagem revelou uma correlação entre a capacidade do espiroplasmas de importar frutose e sua habilidade de induzir sintomas na planta (GAURIVAUD et al., 2000a, 2000b). Esses resultados, indicando diferentes funções da frutose e da glicose na patogenicidade, foram consistentes com dados bioquímicos, mostrando que *S. citri* usa frutose preferencialmente quando ambos os açúcares estão presentes. Em muitas plantas, sacarose é o

principal carboidrato presente no floema, e para ser usada pelo espiroplasma precisa ser clivada por enzimas como sacarose sintase e invertases. As invertases possuem regulação negativa pelos produtos da hidrólise da sacarose, em particular frutose (SAMPIETRO, 1995; WALKER et al., 1997). Perfis metabólicos das plantas infectadas revelaram o acúmulo de açúcares e, mais especificamente, glicose e sacarose nas folhas das plantas sintomáticas, ou seja, naquelas infectadas pelo tipo selvagem GII-3 ou pelo mutante GII3-glc1, mas não nas plantas infectadas pelo mutante GMT 553 do operon da frutose.

Baseado nisso, André et al. (2005) propuseram um modelo onde o consumo de frutose pelos espiroplasmas presentes nos tubos crivados do floema é a principal causa dos sintomas da doença porque interfere com a fisiologia normal das plantas. Em plantas saudáveis, sacarose é importada ativamente pelas células companheiras do floema, onde a invertase vacuolar hidrolisa sacarose em glicose e frutose. Neste caso, a hidrólise da sacarose é limitada por causa da inibição, por *feedback*, da invertase por frutose. Em células infectadas, os espiroplasmas usam preferencialmente a frutose, levando à redução da concentração deste açúcar nas células companheiras do floema e, conseqüentemente, a um aumento da atividade da invertase. Como resultado, mais glicose e frutose são produzidas. Como a glicose não é utilizada, ela acumula-se nas folhas das plantas infectadas o que leva à repressão das enzimas envolvidas na fotossíntese (ANDRÉ et al., 2005). Embora faltem estudos para o *S. kunkelii* no milho, é possível que esses mecanismos de quebra de açúcares ocorram também neste patossistema.

As membranas dos espiroplasmas apresentam elevado conteúdo proteico, sendo a espiralina, uma lipoproteína amfifílica, de 26 KDa, responsável por, aproximadamente, 20% a 30% do total das proteínas dos espiroplasmas, uma das mais abundantes (FOISSAC et al., 1997; BOVÉ et al., 2003). É uma proteína bastante conservada entre as espécies de espiroplasmas, sendo que a espiralina de *S. citri* GII-3 apresenta 83,5%; 85,1% e 88,9% de identidade com as espiralinas de *S. kunkelii*, *S. phoeniceum* e *S. melliferum*, respectivamente (FOISSAC et al., 1997). Esta proteína apresenta um peptídeo-sinal típico de lipoproteínas de Eubactérias antes de um resíduo de cisteína e uma região central altamente conservada, e uma alfa hélice circundada por duas sequências repetidas (HAYASHI; WU, 1990; FOISSAC et al., 1997). A proteína madura é ancorada na camada externa da bicamada de lipídeos por uma N-acetilcisteína enquanto a cadeia polipeptídica inteira fica exposta no meio externo. A função da espiralina não é totalmente conhecida. No entanto, embora não seja essencial à patogenicidade, sabe-se que é requerida para a eficiente transmissão pelo inseto-vetor, pois pode favorecer a aderência do microrganismo às células epiteliais do intestino médio ou às glândulas salivares do inseto-vetor (DURET et al., 2003; KILLINY et al., 2005). Duret et al. (2003) observaram que a ausência de espiralina em mutantes de *S. citri* GII3-9a2 resultou em crescimento, motilidade ou morfologia helicoidal normais dos espiroplasmas, e quando esses mutantes foram injetados no inseto-vetor multiplicaram-se normalmente, resultando em altos títulos no inseto. No entanto, sua transmissão para as plantas hospedeiras foi 100 vezes menos eficiente, nem todas as plantas foram infectadas e o aparecimento de sintomas demorou de 2 a 4 semanas a mais em comparação com os espiroplasmas do tipo selvagem. Com isso, os

autores propuseram duas hipóteses para explicar o papel da espiralina na transmissão pelo inseto--vetor. A primeira afirma que, por ser a proteína de superfície mais abundante, a espiralina pode funcionar como ligante que interage com os receptores localizados nas células epiteliais do intestino médio ou das glândulas salivares, permitindo à bactéria cruzar as barreiras celulares dos insetos. Alternativamente, a espiralina pode ter um papel de proteção, pois forma uma espécie de camada de proteína cobrindo a maioria, se não, todos os lipídeos da bicamada externa da membrana dessas bactérias. Tal proteção pode ser crucial para a sobrevivência do espiroplasma nos tecidos do inseto. No entanto, como existe ainda uma pequena taxa de transmissão desses mutantes para as plantas, outros componentes, além da espiralina podem estar envolvidos na transmissão inseto-planta-hospedeira (DURET et al., 2003).

Variabilidade genética de *S. kunkelii*

O enfezamento pálido, causado por *S. kunkelii*, provoca danos severos na cultura do milho, com redução na produtividade e na qualidade de grãos. No Brasil, onde o milho é cultivado em mais de uma safra ao ano, a ocorrência esporádica e em alta incidência da doença resulta em prejuízos severos. As cigarrinhas infectantes migram de lavouras adultas para aquelas com plântulas recém-germinadas, disseminando esse patógeno (MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004). A estratégia mais eficiente de redução das perdas pela doença é por meio da utilização de cultivares resistentes, uma vez que não existe controle químico para o espiroplasma e o controle da cigarrinha não é eficiente. No

melhoramento do milho visando resistência ao enfezamento causado por espiroplasma é necessário identificar fontes de resistência, conhecer o controle genético da resistência, e também a variabilidade genética do patógeno, que é um microrganismo vivo, variável e que interage com seus hospedeiros (SILVA et al., 2003; CARPANE et al., 2013).

O genoma dos espiroplasmas, como nas bactérias, consiste do genoma core (principal) e do acessório (HACKER; KAPER, 2000). O genoma principal codifica as estruturas necessárias para manutenção do metabolismo e são, conseqüentemente, mais conservadas. Por outro lado, o genoma acessório, que consiste basicamente do cromossoma circular de plasmídeos e de vírus, codifica funções não vitais, como resistência a antibióticos, genes envolvidos na simbiose, patogênese e/ou geração de variabilidade (HACKER; KAPER, 2000; HACKER; CARNIEL, 2001), sendo mais propício a mutações.

Vários mecanismos de geração de variabilidade, que podem levar ao aparecimento de novos patótipos, já foram identificados no genoma de espiroplasmas, por exemplo, pequenas modificações na sequência de DNA, que podem ocorrer em razão da substituição de nucleotídeos durante a replicação ou reparo do DNA (MELCHER; FLETCHER, 1999). Um segundo mecanismo envolve o rearranjo de fragmentos maiores de DNA por deleção, inserção, duplicação ou inversão (MELCHER et al., 1999) e o terceiro mecanismo envolve a integração de DNA extra-cromossomal no genoma dos espiroplasmas (SHA et al., 2000), como vírus que são particularmente importantes fontes de variabilidade genética, pois podem integrar-se nos cromossomas em uma ou mais cópias. No entanto, informações sobre a variabilidade genética de

espiroplasmas são escassas e necessitam de maior investigação envolvendo amostragem mais ampla e abrangente das áreas de cultivo da espécie vegetal em estudo.

Barros et al. (2001) desenvolveram primers específicos baseados nas regiões conservadas do gene da espiralina, a principal proteína de membrana dos espiroplasmas, para amplificação parcial do gene, visando à detecção e identificação de *S. kunkelii*. A sequência amplificada por esses primers apresenta regiões variáveis, tornando possível a identificação de isolados de *S. kunkelii* em infecção mista e também em amostras de campo. Gomes et al. (2004) usaram esses primers em estudos de variabilidade genética de isolados de *S. kunkelii* de milho de diferentes regiões geográficas do Brasil, obtendo similaridade de 98% entre os isolados analisados. Os resultados demonstraram que esta região do gene da espiralina apresenta alto grau de conservação entre os isolados brasileiros. Estes também apresentaram 98% de similaridade com a sequência do gene da espiralina de *S. kunkelii* isolado na França NCBI U57659 (FOISSAC et al., 1997). Estudos adicionais são necessários para a identificação de regiões do genoma que sejam menos conservadas.

Castanheira (2005) avaliou a diversidade genética de isolados de *S. kunkelii* adquiridos em plantas de milho que apresentavam sintomas característicos de enfezamento pálido, em diferentes regiões brasileiras produtoras no Brasil: Dourados, MS, Itumbiara, GO, Sete Lagoas, MG e Uberlândia, MG. Após a aquisição em plantas de milho nas lavouras e inoculação em plântulas de cultivar de milho-pipoca mantidas em viveiro telado protegido contra insetos, os isolados de espiroplasma foram preservados nesse sistema in vivo, através de repetição periódica e contínua de aquisição-inoculação no milho-pipoca, utilizando-se os procedimentos descritos no

Capítulo 10 deste livro. Para os estudos de diversidade molecular, esses isolados-geográficos de *S. kunkelii* foram reisolados da nervura central de folhas das plantas de milho-pipoca infectadas, e foram cultivados em meio de cultura líquido LD8A3, pelo período de incubação de um mês em estufa a 30 °C, na ausência de luz (LEE; DAVIS, 1989; CASTANHEIRA, 2005) (ver tópico abaixo). Após esse período, o DNA desses microrganismos foi extraído, utilizando-se tampão de lise composto de 300 mM Tris-HCl pH 8,0, 30 mM EDTA pH 8,0, 3% SDS e 1,5 M NaCl, seguido de extração com fenol-clorofórmio e clorofórmio e precipitação do DNA com isopropanol, conforme descrito por Carneiro et al. (2003). O DNA extraído foi submetido à análise da diversidade genética por meio de marcador molecular Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP*), que é uma metodologia que faz uma amostragem de todo o genoma do microrganismo e não de apenas um gene específico, como no caso da utilização de sequência parcial da espiralina. Foram utilizadas 10 combinações de primers e obtidos 448 alelos. No entanto, o polimorfismo de 26% (Figura 1; Tabela 1) e a diversidade genética total (HT) de 0,0773 indicaram baixo nível de variabilidade genética entre os isolados.

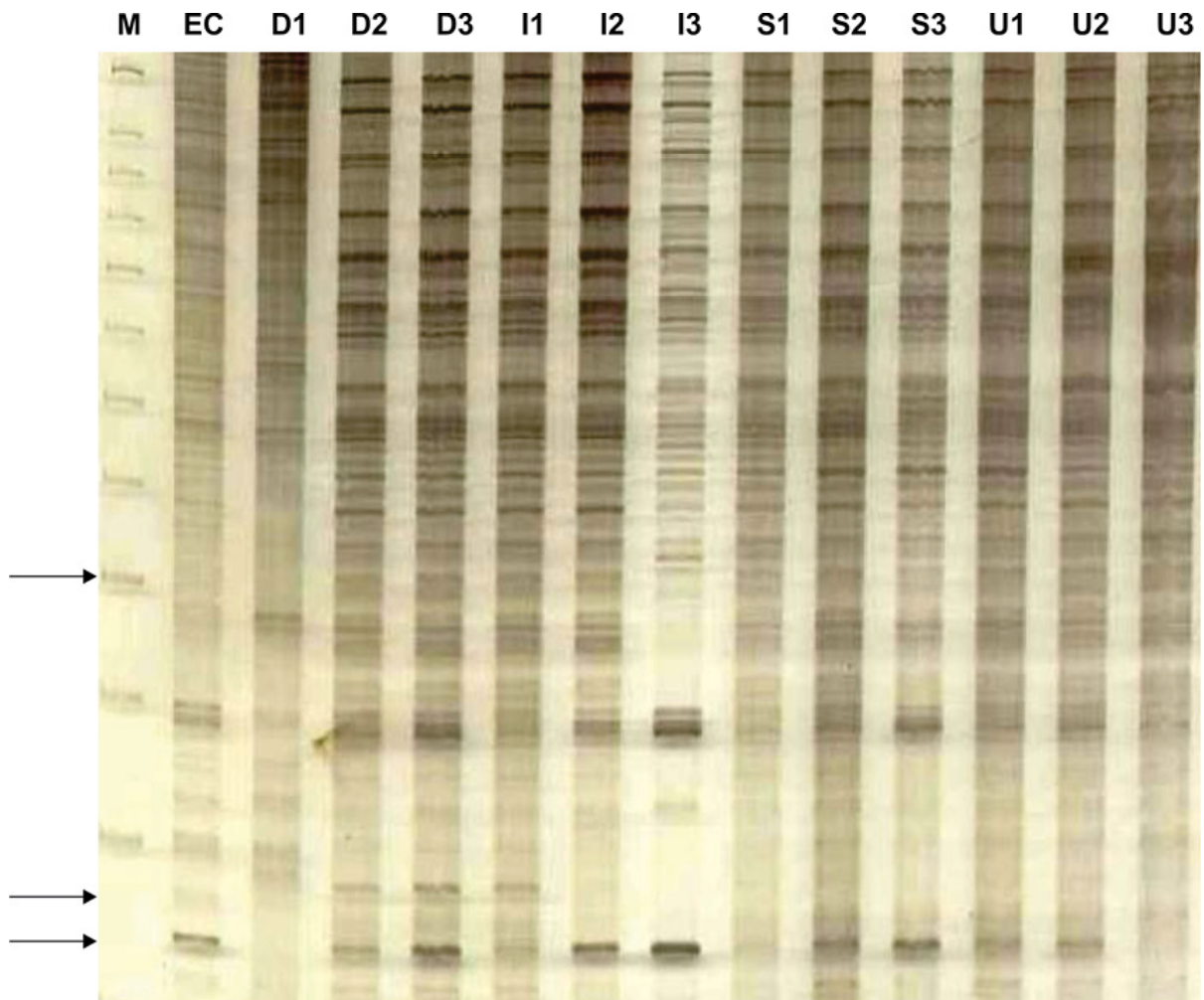


Figura 1. Gel de AFLP corado com prata mostrando fragmentos de DNA de *Spiroplasma kunkelli* gerados pela digestão com as enzimas de restrição *EcoRI*-G + *MseI*-0. M = marcador de peso molecular; EC = *Escherichia coli*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia. As setas indicam bandas polimórficas. Números indicam repetições biológicas.

Tabela 1. Combinações de primers, número total de alelos e porcentagem de polimorfismo utilizados para análise dos isolados de *Spiroplasma kunkelii* pela técnica de AFLP.

Combinação de primers	Amplitude alélica (bp)	Numero de bandas		
		Total	Polimorfismo	%
<i>EcoR1-A + Msel-A</i>	151–467	19	6	31,6
<i>EcoR1-A + Msel-C</i>	81–486	28	8	28,6
<i>EcoR1-C + Msel-A</i>	56–486	74	17	23,0
<i>EcoR1-C + Msel-C</i>	84–479	62	23	37,1
<i>EcoR1-C + Msel-G</i>	133–482	35	3	8,6
<i>EcoR1-C + Msel-T</i>	75–442	51	15	29,4
<i>EcoR1-G + Msel-O</i>	96–490	62	21	33,9
<i>EcoR1-G + Msel-A</i>	119–496	47	21	44,7
<i>EcoR1-G + Msel-C</i>	120–475	55	5	9,1
<i>EcoR1-G + Msel-G</i>	152–436	15	0	0
Total	56–496	448	119	26,6
Média	106,7–473,9	44,8	11,9	26,6

Os resultados da identidade genética e distância genética de Nei encontram-se na Tabela 2. A identidade genética de Nei (NEI, 1987) foi semelhante para todas as combinações, em média 0,95, indicando que os isolados de espiroplasma avaliados apresentam alto grau de similaridade genética, com frequências alélicas semelhantes. Os valores da distância genética de Nei variaram de 0,0277 a 0,0756, sendo que as maiores distâncias genéticas (0,0641 a 0,0756) foram verificadas nas comparações envolvendo o isolado de Uberlândia. A distância genética de Nei, média de 0,05, isto é, 5 substituições a cada 100 marcadores, indica um valor muito baixo obtido para os espiroplasmas, confirmando a semelhança nas

frequências alélicas destes. O dendrograma construído a partir da medida de similaridade e o método de agrupamento pela média de grupo (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* – UPGMA) apresentado na Figura 2 mostram que a menor similaridade genética observada foi de 0,83 entre o isolado de Uberlândia e o grupo formado pelos demais isolados.

Tabela 2. Identidade e distância genética de Nei para os isolados de *Spiroplasma kunkelii*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

Isolado	D	I	S	U
D	–	0,9727 ⁽¹⁾	0,9642	0,9278
I	0,0277 ⁽²⁾	–	0,9717	0,9272
S	0,0365	0,0287	–	0,9379
U	0,0749	0,0756	0,0641	–

⁽¹⁾ Identidade genética de Nei: acima da diagonal.

⁽²⁾ Distância genética de Nei: abaixo da diagonal.

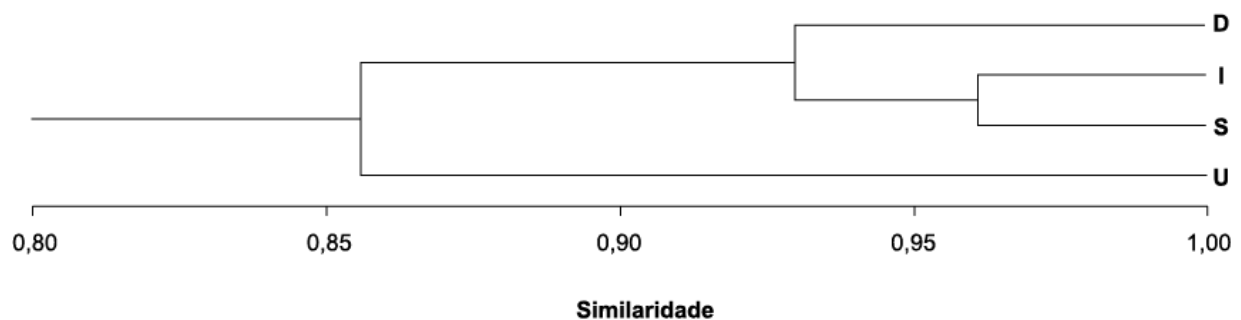


Figura 2. Dendrograma da similaridade genética entre os isolados geográficos de *Spiroplasma kunkelii* utilizando o método de agrupamento de UPGMA. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

Utilizando os mesmos isolados de *S. kunkelii* descritos no item anterior, Castanheira (2005) amplificou o gene da espiralina com primers específicos (BARROS et al., 2001) e digeriu o amplicon obtido com cinco enzimas de restrição: *Bam*HI, *Dra*I, *Hin*fl, *Mse*I, *Xmn*I para avaliar a diversidade de toda a sequência deste gene. Verificou-se que, para cada uma das enzimas testadas, o padrão de restrição foi o mesmo para os diferentes isolados, demonstrando que tanto para o gene da espiralina quanto para as suas regiões flanqueadoras não houve diferença no polimorfismo de comprimento dos amplicons gerados (Figura 3). Isto é, não foi possível detectar variabilidade genética, o que está de acordo com a literatura, onde a análise da sequência de nucleotídeos do gene da espiralina de *S. kunkelii* tem confirmado que esta é conservada (GOMES et al., 2004).

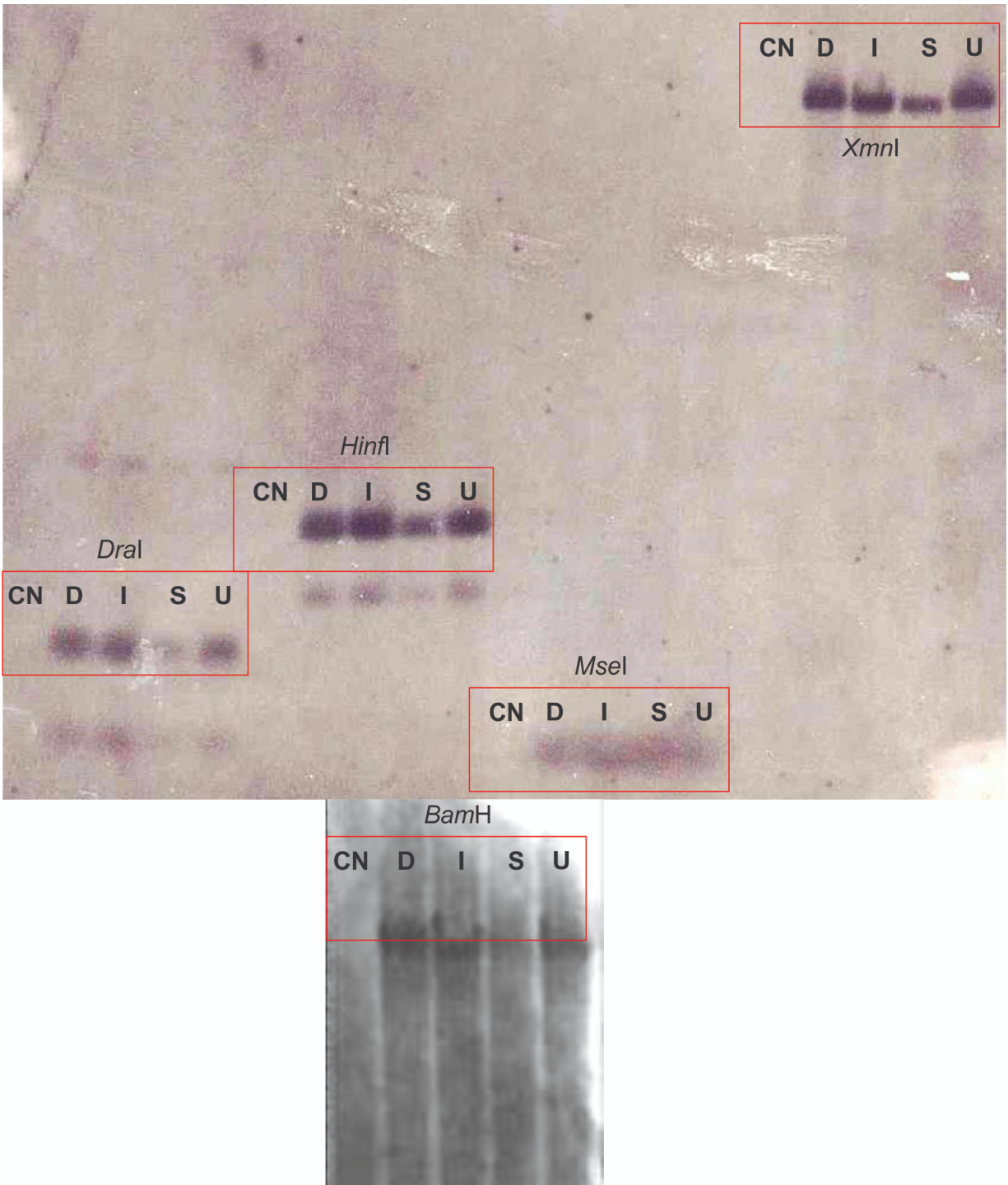


Figura 3. Padrões de RFLP obtidos com 5 diferentes enzimas de restrição: *DraI*, *HinfI*, *MseI*, *XmnI* e *BamHI* abaixo. Os destaques em vermelho evidenciam o mesmo padrão de bandas para cada enzima. CN = Controle negativo (planta sadia); isolados de *Spiroplasma kunkelii*: D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

Uma possível explicação para a baixa diversidade genética observada entre os isolados de *S. kunkelii* coletados no Brasil pode ser a homogeneidade entre populações de cigarrinha, vetor desse patógeno. Oliveira et al. (2007) relataram que populações de cigarrinhas *D. maidis* coletadas na região Centro-Sul do Brasil apresentaram índice de similaridade genética superior a 0,72. Este elevado valor é por causa da ocorrência de fluxo gênico entre as populações dessa região, mediado pela capacidade dessa espécie de migrar a longas distâncias. Uma vez que existe interação entre o vetor e o patógeno, é possível que a elevada similaridade entre essas populações de cigarrinha esteja contribuindo para uma menor variabilidade genética dos isolados de espiroplasma.

Carpane et al. (2013) estimaram a variabilidade genética de isolados de *S. kunkelii* obtidos de diferentes regiões geográficas e ecológicas da Argentina, Brasil, Estados Unidos, Costa Rica e México. Foram utilizados vários conjuntos de primers que amplificam diferentes regiões do genoma com o objetivo de se verificar a existência de correlação do perfil molecular com a origem geográfica ou com a época de isolamento do patógeno. Entre esses, foram utilizados primers que reconhecem as extremidades conservadas das inserções virais para detectar polimorfismos entre estas, primers para o gene da espiralina, proteína de membrana, primers randômicos de dez nucleotídeos para análise por fragmentos de DNA amplificados ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD*), além de BOX, REP e ERIC que amplificam elementos repetitivos do genoma de Eubactérias. Os resultados mostraram que, independentemente da região do genoma analisada e da metodologia utilizada, todos os isolados de *S. kunkelii* incluídos nesse estudo foram altamente similares geneticamente, apesar de serem provenientes de diferentes países e diferentes épocas de

coleta. Segundo os autores, os resultados obtidos sugerem que é pouco provável que a reemergência da doença do enfezamento em cultivares de milho anteriormente resistentes seja devida à variabilidade genética do patógeno, o que possibilitaria a seleção de isolados resistentes. Ao invés disso, a quebra da resistência pode ser devida a alterações de outros elementos do patossistema, tais como a dinâmica do inseto--vetor ou as condições ambientais. Além disso, segundo os autores, a resistência de cultivares de milho ao *S. kunkellii* deve ser estável tanto no tempo quanto na localização geográfica, em decorrência da baixa variabilidade detectada no genoma desse patógeno.

Isolamento e cultivo in vitro de *S. kunkellii* de milho de diferentes regiões geográficas do Brasil

Para o isolamento e cultivo in vitro de *S. kunkellii* de milho de diferentes regiões geográficas do Brasil, plantas apresentando sintomas típicos de enfezamento pálido foram coletadas nas regiões de Dourados, MS, Itumbiara, GO, Sete Lagoas, MG, e Uberlândia, MG (CASTANHEIRA, 2005). Para o isolamento e cultivo de *S. kunkellii* em meio de cultura, DNA foi extraído de folhas de plantas de milho sintomáticas (Figura 4), seguido por teste de PCR multiplex, com primers específicos para detecção de fitoplasma e de *S. kunkellii* (LEE et al., 1993; BARROS et al., 2001). Somente foram utilizadas, para o isolamento, as amostras que foram positivas apenas para infecção pelo espiroplasma (Figura 5). A nervura central da folha, por seu grande conteúdo em células do floema, foi

utilizada para o isolamento do patógeno, utilizando-se 2 cm desta a partir da base. O processo de isolamento foi realizado em capela de fluxo laminar. Os segmentos da nervura central das amostras de folhas foram esterilizados superficialmente, por meio da imersão em etanol 70%, durante dois minutos, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio 10%, por dois minutos, e três enxágues em água destilada esterilizada. Após a desinfecção superficial, os segmentos de nervuras das folhas foram colocados em placa de Petri esterilizada, e com o auxílio de uma pinça e de um bisturi, devidamente esterilizados, e foram fragmentados em pequenos pedaços, para facilitar a extração do espiroplasma.





Figura 4. Plantas de milho com sintomas típicos de enfezamento pálido causado por *Spiroplasma kunkelli*.

Fotos: Isabel Regina Prazeres de Souza

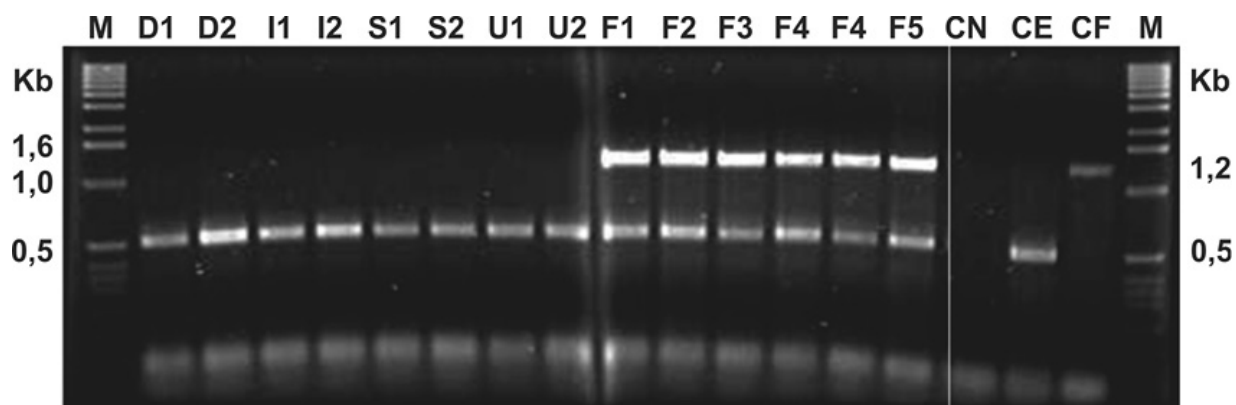


Figura 5. Amplicons obtidos de PCR multiplex, com primers específicos para detecção de *Spiroplasm kunkelli* e fitoplasma em plantas de milho sintomáticas para enfezamento pálido. M = Marcador molecular Ladder 1Kb; D = Espiroplasma/Dourados; I = Espiroplasma/Itumbiara; S = Espiroplasma/Sete Lagoas; U = Espiroplasma/Uberlândia; F = Fitoplasma; CN = Controle negativo; CE = Controle Espiroplasma; CF = Controle Fitoplasma. Números diferentes indicam plantas diferentes para cada isolado.

Observa-se que a etapa de isolamento do espiroplasma é uma das etapas críticas, e deve ser realizada com extremo cuidado, em razão da facilidade de contaminação, por envolver esterilização apenas superficial do tecido vegetal e meio de cultivo muito rico.

Na placa de Petri contendo o tecido vegetal fragmentado, foram adicionados 5 mL do meio de cultivo LD8A3 (LEE; DAVIS, 1989), sem a adição de soro fetal bovino (Tabela 3). O líquido na placa foi

coletado utilizando-se seringa de 5 mL e passado em um filtro com membrana de 0,45 μm adaptado a essa seringa. Em um tubo de vidro de tampa rosqueável, com capacidade para 15 mL, foram colocados 0,5 mL da solução filtrada, contendo espiroplasmas, e 4,5 mL do meio completo; isto é, contendo soro fetal bovino. Desta solução, foram coletados 2,5 mL e transferidos para um segundo tubo, onde foram adicionados 2,5 mL de meio completo. Desse segundo tubo, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL, e acrescentados 4,5 mL de meio completo. A diluição final foi de 1:200. Esses tubos com meio de cultura para crescimento de espiroplasmas foram incubados em estufa a 30 °C na ausência de luz, por 17 a 20 semanas. A confirmação do crescimento dos microrganismos foi feita por meio de microscopia óptica de contraste de fase e por Western Blot utilizando anticorpos IgG antiespiroplasma. Para visualização ao microscópio, alíquotas de 15 μL foram retiradas do meio de cultivo, utilizando-se câmara de fluxo laminar e material esterilizado. Como forma de evitar a contaminação, essas alíquotas eram retiradas de tubos preparados em maior número, para serem utilizados especificamente para acompanhamento do desenvolvimento do patógeno.

Tabela 3. Composição do meio LD8A3 para cultivo in vitro de *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb.

Meio de cultivo LD8A3	
L-Arginina	0,6 g
L-Asparagina	0,6 g
L-Metionina	0,4 g
Ácido α -Cetoglutárico	0,4 g
Ácido Pirúvico	0,4 g
D-Frutose	1,0 g
Sacarose	120,0 g
PPLO Broth	15,0 g
Lactalbumina hidrolisada	2,0 g
Água ultrapura (q.s.p)	900 mL
Soro fetal bovino ⁽¹⁾	100 mL

⁽¹⁾ Todos os componentes, exceto o soro fetal bovino, foram adicionados a um béquer com 500 mL de água ultrapura, o pH da solução foi ajustado para 7,5 e o volume foi completado para 900 mL com água ultrapura. Após a autoclavagem durante 30 minutos a 120 °C, foram adicionados 100 mL de soro fetal bovino estéril filtrado.

Fonte: adaptado de Lee e Davis (1989).

O crescimento do espiroplasma em meio de cultura foi lento, com o isolado de Sete Lagoas apresentando crescimento em 17 semanas e os demais em cerca de 20 semanas. Foi possível detectar a presença de espiroplasma nos meios de cultura com técnica de Western Blotting, utilizando meios com 11 semanas de cultivo, e após 17 semanas, através de microscopia óptica de contraste de fase, sendo possível avaliar esse crescimento visualmente (Figura 6). Uma explicação para o lento crescimento observado seria o fato de que esses isolados nunca tinham sido cultivados in vitro. É

possível que o tempo para crescimento possa ser reduzido à medida que cada isolado seja sucessivamente multiplicado *in vitro*, selecionando na população do patógeno aqueles mais adaptadas ao meio de cultura. O crescimento mais rápido dos isolados de Sete Lagoas, provavelmente, foi devido ao fato de que eles estavam sendo mantidos *in vivo* sucessivamente em apenas uma cultivar de milho, usando sempre a mesma população de cigarrinhas, proporcionando maior homogeneidade ao isolado.



Figura 6. Fotografia ao microscópio óptico de contraste de fase mostrando *Spiroplasma kunkelii* crescendo em meio de cultivo (magnificação de 1000X).

Considerações finais

Apesar das dificuldades, como a presença de sequências repetitivas de plectovírus, aliadas às limitações das técnicas de sequenciamento de DNA e de montagem de genomas, os projetos de sequenciamento de espiroplasmas já elucidaram importantes questões sobre o metabolismo, patogenicidade e dinâmica do genoma, além do entendimento da associação entre os espiroplasmas e seus hospedeiros.

Com isso, com os recursos moleculares disponíveis, tais como o sequenciamento do genoma de *S. kunkelli*, novas informações sobre a diversidade genética e ocorrência e distribuição do patógeno estão surgindo. Isso pode levar a um melhor entendimento dos mecanismos de resistência de milho ao espiroplasma, o que pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias efetivas de melhoramento de plantas resistentes a este importante patógeno.

Referências

ANDRÉ, A.; MacCHERONI, W.; DOIGNON, F.; GARNIER, M.; RENAUDIN, J. Glucose and trehalose PTS permeases of *Spiroplasma citri* probably share a single IIA domain, enabling the spiroplasma to adapt quickly to carbohydrate changes in its environment. **Microbiology**, v. 149, p. 2687-2696, 2003.

ANDRÉ, A.; MAUCOURT, M.; MOING, A.; ROLIN, D.; RENAUDIN, J. Sugar import and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*: glucose and fructose play distinct roles. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 33-42, 2005.

BAI, X.; HOGENHOUT, S. A. A genome sequence survey of the mollicute corn stunt spiroplasma *Spiroplasma kunkelii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, p. 7-17, 2002.

BAI, X.; ZHANG, J.; HOLFORD, I. R.; HOGENHOUT, S. A. Comparative genomics identifies genes shared by distantly related insect-transmitted plant pathogenic mollicutes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 235, p. 249-258, 2004.

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

BERTACCINI, A.; CONTALDO, N.; CALARI, A.; PALTRINIERI, S.; WINDSOR, H. M.; WINDSOR, D. Preliminary results of axenic growth of phytoplasmas from micropropagated infected periwinkle shoots. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR MYCOPLASMOLOGY, 18., 2010, Chianciano Terme. **Abstracts...** Chianciano Terme: International Organization for Mycoplasmaology, 2010. p. 153.

BERTACCINI, A.; DUDUK, B.; PALTRINIERI, S.; CONTALDO, N. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 1763-1788, 2014.

BOLAÑOS, L. M.; SERVÍN-GARCIDUEÑAS, L. E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Arthropod-Spiroplasma relationship in the genomic era. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, p. 1-8, 2015.

BOUTAREAUD, A.; DANET, J. L.; GARNIER, M.; SAILLARD, C. Disruption of a gene predicted to encode a solute binding protein of an ABC transporter reduces transmission of *Spiroplasma citri* by the leafhopper *Circulifer haematoceps*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3960-3967, 2004.

BOVÉ, J. M.; RENAUDIN, J.; SAILLARD, C.; FOISSAC, X.; GARNIER, M. *Spiroplasma citri*, a plant pathogenic mollicute: relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 483-500, 2003.

CARLE, P.; SAILLARD, C.; CARRÈRE, N.; CARRÈRE, S.; DURET, S.; EVEILLARD, S.; GAURIVAUD, P.; GOURGUES, G.; GOUZY, J.; SALAR, P.; VERDIN, E.; BRETON, M.; BLANCHARD, A.; LAIGRET, F.; BOVÉ, J.-M.; RENAUDIN, J.; FOISSAC, X. Partial chromosome sequence of *Spiroplasma citri* reveals extensive viral invasion and important gene decay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3420-3426, 2010.

CARNEIRO, N. P.; CASTANHEIRA, A. L. M.; SOUZA, I. R. P. de; OLIVEIRA, C. M. de; OLIVEIRA, E. de; LANA, U. G. de P.; PAIVA, E. **Extração de DNA Spiroplasma kunkelii Whitcomb cultivado in vitro**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 4 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 34).

CARPANE, P.; MELCHER, U.; WAYADANDE, A.; PECCI, M. de la P. G.; LAGUNA, G.; DOLEZAL, W.; FLETCHER, J. An analysis of the genomic variability of the phytopathogenic mollicute *Spiroplasma kunkelii*. **Phytopathology**, v. 103, p. 129-134, 2013.

CASTANHEIRA, A. L. M. **Diversidade genética de isolados de Spiroplasma kunkelii e reações em genótipos de milho**. 2005. 150 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CHANG, C. J. Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle. **Phytopathology**, v. 88, p. 1347-1350, 1998.

CHEN, T. A.; LIAO, C. H. Corn stunt spiroplasma: isolation, cultivation, and proof of pathogenicity. **Science**, v. 188, p. 1015-1017, 1975.

CONTALDO, N.; BERTACCINI, A.; PALTRINIERI, S.; WINDSOR, H. M.; WINDSOR, D. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 51, p. 607-617, 2012.

DANIELS, M. J. Mechanisms of spiroplasma pathogenicity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, p. 29-43, 1983.

DURET, S.; BERHO, N.; DANET, J. L.; GARNIER, M.; RENAUDIN, J. Spiralin is not essential for helicity, motility, or pathogenicity but is required for efficient transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector *Circulifer haematoceps*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6225-6234, 2003.

- DURET, S.; DANET, J. L.; GARNIER, M.; RENAUDIN, J. Gene disruption through homologous recombination in *Spiroplasma citri*: an scm1-disrupted motility mutant is pathogenic. **Journal of Bacteriology**, v. 24, p. 7449-7456, 1999.
- FOISSAC, X.; JOSEPH, M. B.; SAILLARD, C. Sequence analysis of *Spiroplasma phoeniceum* and *Spiroplasma kunkelii* spiralin genes and comparison with other spiralin genes. **Current Microbiology**, v. 35, p. 240-243, 1997.
- GASPARICH, G. E. Spiroplasmas: evolution, adaptation and diversity. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 619-640, 2002.
- GASPARICH, G. E. Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. **Biologicals**, v. 38, p. 193-203, 2010.
- GAURIVAUD, P.; DANET, J.-L.; LAIGRET, F.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Fructose utilization and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 1145-1155, 2000a.
- GAURIVAUD, P.; LAIGRET, F.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Characterization of FruR as a putative activator of the fructose operon of *Spiroplasma citri*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 198, p. 73-78, 2001.
- GAURIVAUD, P.; LAIGRET, F.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Fructose utilization and pathogenicity of *Spiroplasma citri*: characterization of the fructose operon. **Gene**, v. 252, p. 61-69, 2000b.
- GOMES, E.; JARDIM, J.; GUIMARÃES, C.; SOUZA, I. D.; OLIVEIRA, E. D. Genetic variability of Brazilian phytoplasma and spiroplasma isolated from maize plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 61-65, 2004.
- HACKER, J.; CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. **EMBO Reports**, v. 2, p. 376-381, 2001.
- HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 641-679, 2000.
- HAYASHI, S.; WU, H. C. Lipoproteins in bacteria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 22, p. 451-471, 1990.
- HERREN, J. K.; LEMAITRE, B. *Spiroplasma* and host immunity: activation of humoral immune responses increases endosymbiont load and susceptibility to certain Gram-negative bacterial pathogens in *Drosophila melanogaster*. **Cellular Microbiology**, v. 13, p. 1385-1396, 2011.
- KILLINY, N.; CASTROVIEJO, M.; SAILLARD, C. *Spiroplasma citri* spiralin acts in vitro as a lectin binding to glycoproteins from its insect vector *Circulifer haematoceps*. **Phytopathology**, v. 95, p. 541-548, 2005.
- KONAI, M.; CLARK, E. A.; CAMP, M.; KOEH, A. L.; WHITCOMB, R. F. Temperature ranges, growth optima, and growth rates of *Spiroplasma* (Spiroplasmataceae, class Mollicutes)

species. **Current Microbiology**, v. 32, p. 314-319, 1996.

KU, C.; LO, W.-S.; CHEN, L. L.; KUO, C.-H. Complete genomes of two dipteran-associated spiroplasmas provided insights into the origin, dynamics, and impacts of viral invasion in *Spiroplasma*. **Genome Biology and Evolution**, v. 5, p. 1151-1164, 2013.

LEE, I. M.; DAVIS, R. E. Serum-free media for cultivation of spiroplasma. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 1092-1099, 1989.

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

LEE, I. M.; MARTINI, M.; MARCONE, C.; ZHU, S. F. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' for the phytoplasma associated with elm yellows. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 337-347, 2004.

LEGRAND, A. I.; POWER, A. G. Inoculation and acquisition of maize bushy stunt mycoplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals of Applied Biology**, v. 125, p. 115-122, 1994.

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**, v. 24, p. 136-142, 1999.

MELCHER, U.; FLETCHER, J. Genetic variation in *Spiroplasma citri*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 519-533, 1999.

MELCHER, U.; SHA, Y.; YE, F.; FLETCHER, J. Mechanisms of spiroplasma genome variation associated with SpV1-like viral DNA inferred from sequence comparisons. **Microbial & Comparative Genomics**, v. 4, p. 29-46, 1999.

MOYA-RAYGOZA, G.; NAULT, L. R. Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn-leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 91, p. 668-676, 1998.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University, 1987. 512 p.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; NAULT, L. R. Genetic diversity in populations of *Dalbulus maidis* (Delong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) from distant localities in Brazil assessed by RADP-PCR markers. **Environmental Entomology**, v. 36, p. 204-212, 2007.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R.; NAULT, L. R. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 147, p. 141-153, 2013.

OLIVEIRA, E.; DUARTE, A. P.; CARVALHO, R. V. de; OLIVEIRA, A. C. de. Mollicutes e vírus na cultura do milho no Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In:

OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, C. M. de. (Ed.). **Doenças em milho**: mollicutes, vírus, vetores, mancha por *Phaeosphaeria*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 17-34.

OLIVEIRA, E.; LANDAU, E. C.; SOUSA, S. M. Simultaneous transmission of phytoplasma and spiroplasma by *Dalbulus maidis* leafhopper and symptoms of infected maize. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, p. 99-100, 2015.

SAMPIETRO, A. R. The plant invertases. In: SALERNO, G. L.; ECHEVERRIA, E. J. (Ed.). **Sucrose metabolism, biochemistry, physiology, and molecular biology**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1995. p. 65-71.

SHA, Y.; MELCHER, U.; DAVIS, R. E.; FLETCHER, J. Common elements of spiroplasma plectoviruses revealed by nucleotide sequence of SVTS2. **Virus Genes**, v. 20, p. 47-56, 2000.

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

WALKER, R. P.; WINTERS, A. L.; POLLOCK, C. J. Purification and characterization of invertases from leaves of *Lolium temulentum* L. **New Phytologist**, v. 135, p. 259-266, 1997.

WILLIAMSON, D. L.; WHITCOMB, R. F. Plant mycoplasmas: a cultivable spiroplasma causes corn stunt disease. **Science**, v. 188, p. 1018-1020, 1975.

WILLIAMSON, D. L.; WHITCOMB, R. F.; TULLY, J. G.; GASPARICH, G. E.; ROSE, D. L.; CARLE, P.; BOVÉ, J. M.; HACKETT, K. J.; ADAMS, J. R.; HENEGAR, R. B.; KONAI, M.; CHASTEL, C.; FRENCH, F. E. Revised group classification of the genus *Spiroplasma*. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v. 48, p. 1-12, 1998.

YU, J.; WAYADANDE, A. C.; FLETCHER, J. *Spiroplasma citri* surface protein P89 implicated in adhesion to cells of the vector *Circulifer tenellus*. **Phytopathology**, v. 90, p. 716-722, 2000.

ZHAO, Y.; HAMMOND, R. W.; JOMANTIENE, R.; DALLY, E. L.; LEE, I.-M.; JIA, H.; WU, H.; LIN, S.; ZHANG, P.; KENTON, S.; NAJAR, F. Z.; HUA, A.; ROE, B. A.; FLETCHER, J.; DAVIS, R. E. Gene content and organization of an 85-kb DNA segment from the genome of the phytopathogenic mollicute *Spiroplasma kunkelii*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 269, p. 592-602, 2003.

Capítulo 5

Cigarrinhas na cultura do milho no Brasil

Charles Martins de Oliveira | Ranyse Barbosa Querino | Marina Regina Frizzas



Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho, atrás dos Estados Unidos da América (EUA) e da China (USDA, 2014) e, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Usda), foi responsável por cerca 7,5% da produção de milho na safra 2013/2014 (USDA, 2014). Embora exista um bom nível de conhecimento sobre as principais pragas que causam danos diretos à cultura (CRUZ, 2008; CRUZ et al., 2008), poucas informações estão disponíveis no Brasil sobre a diversidade das espécies de cigarrinhas que ocorrem no milho, e também há carência de informações sobre a ocorrência das espécies que são potencialmente vetores de vírus e de mollicutes nessa cultura.

A subordem Auchenorrhyncha (Insecta: Hemiptera), táxon que contempla as cigarrinhas, conta com aproximadamente 4.000 espécies conhecidas no Brasil (GRAZIA et al., 2012), e as cigarrinhas pertencentes às famílias Cicadellidae (subfamília Deltocephalinae) e Delphacidae, que são muito abundantes em poáceas, constituem o principal grupo de vetores de vírus e de mollicutes, nas Américas (LOPES; OLIVEIRA, 2004).

No planeta, mais de 20 viroses e enfezamentos, cujos agentes causais são transmitidos por insetos, podem ocorrer na cultura do milho (NAULT, 1980; REMES LENICOV et al., 1985; SHURTLEFF, 1992; THOTTAPPILLY et al., 1993; VELAZQUEZ et al., 2006). Nas Américas, diversos fitopatógenos são transmitidos por cigarrinhas. Nos EUA, ocorrem *Maize chlorotic dwarf virus* e *Maize fine streak virus* transmitidos, principalmente, pela cigarrinha *Graminella nigrifrons* (Forbes) (Hemiptera: Cicadellidae) (CHOUDHURY; ROSENKRANZ, 1983; NAULT, 1989; REDINBAUGH et al., 2002). Nos EUA, no Peru e na Venezuela, ocorre o *Maize stripe virus* transmitido por *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Hemiptera: Delphacidae) (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2011), e na Argentina, o *Mal de Río Cuarto virus*, que é transmitido pela cigarrinha *Delphacodes kuscheli* Fennah (Hemiptera: Delphacidae), e que causa prejuízos severos na produção do milho, quando ocorre em surtos epidêmicos (LENARDÓN et al., 1998; ORNAGHI et al., 1999; TRUOL et al., 2001).

No Brasil, a cigarrinha *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) é responsável pela transmissão dos agentes causais do enfezamento-pálido, *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb et al. (“corn stunt spiroplasma”), e do enfezamento-vermelho (“maize bushy stunt phytoplasma”), além de *Maize rayado fino virus* (NAULT, 1980, 1990; LOPES; OLIVEIRA, 2004). A doença faixa clorótica do milho, é causada por um rhabdovirus, transmitido por *P. maidis* (FALK; TSAI, 1985; LASTRA, 1977), e essa doença tem sido encontrada em vários estados brasileiros, porém com baixa incidência (KITAJIMA et al., 1976; KITAJIMA; VAN DER PAHLEN, 1977; KITAJIMA; COSTA, 1982).

A diversidade de espécies (abundância e riqueza de espécies), dentro dos vários grupos de insetos, incluindo-se as cigarrinhas, pode variar grandemente em micro, meso e macroescala, em função de vários fatores, como o clima, a vegetação e o relevo (ARAÚJO et al., 2014; LIU et al., 2014; SCHERBER et al., 2014). Sob essa ótica, é possível hipotetizar que, em função da grande extensão territorial do Brasil, e das suas inúmeras combinações de relevo, clima e vegetação, e do sistema de produção de milho nas diferentes regiões, a fauna de cigarrinhas deve ser diferente entre regiões geograficamente distintas, o que pode determinar quais grupos de vetores, e potenciais vetores, ocorrem em cada uma delas.

O conhecimento de aspectos referentes à identificação, biologia e ecologia dos insetos--vetores de vírus e de mollicutes, bem como das características epidemiológicas pertinentes à incidência e aos danos das doenças que causam, é essencial para o desenvolvimento e o uso de alternativas de controle dessas enfermidades presentes no território nacional. Esses aspectos são importantes também para a mitigação de riscos referentes à possível introdução, no Brasil, de fitopatógenos e de seus insetos--vetores, já que o País possui aproximadamente 15,7 mil quilômetros de fronteiras com países da América do Sul (IBGE, 2015).

Apenas dois estudos foram conduzidos no Brasil para avaliar a fauna de cigarrinhas (Cicadellidae e Delphacidae) na cultura do milho (LOPES; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2013). Neste capítulo, esses dois estudos e alguns dados inéditos de estudos recentes serão utilizados como base para consolidar as informações disponíveis acerca da diversidade de cigarrinhas (Cicadellidae e Delphacidae) na cultura do milho, em diversas regiões produtoras no Brasil, e será discutida também a presença de espécies vetores, e potencialmente vetores, de fitopatógenos nessa cultura.

Famílias Cicadellidae e Delphacidae (Insecta: Hemiptera)

A ordem Hemiptera, a mais diversa entre os insetos hemimetábolos, contém aproximadamente 89.000 espécies no planeta, distribuídas em quatro subordens, Heteroptera, Auchenorrhyncha, Sternorrhyncha e Coleorrhyncha, sendo que esta última não ocorre no Brasil (GRAZIA et al., 2012).

A subordem Auchenorrhyncha, à qual pertencem as cigarrinhas, são insetos terrestres que se alimentam da seiva das plantas, diretamente no xilema, floema ou mesófilo, exceto algumas espécies de Fulgoroidea (Achilidae e Derbidae), cujas ninfas se alimentam de fungos (CAVICHIOLO; TAKIYA, 2012). O número de espécies de Auchenorrhyncha descritas está entre 25.000 e 42.000 (GRIMALDI; ENGEL, 2005; DEITZ et al., 2008), com estimativa de 4.000 espécies para a fauna brasileira (GRAZIA et al., 2012). Entretanto, alguns autores acreditam que esse número não pode ser estimado, em função da falta de revisões taxonômicas extensas para a maioria dos grupos que ocorre no Brasil (CAVICHIOLO; TAKIYA, 2012). Entre os Auchenorrhyncha, Cicadellidae (superfamília Membracoidea) e

Delphacidae (superfamília Fulgoroidea) se destacam por apresentarem insetos-vetores de agentes causadores de doenças em milho.

Os representantes de Cicadellidae se caracterizam por apresentarem quatro fileiras de espinhos, com tamanho e densidade diferentes, nas tíbias das pernas posteriores (Figura 1A)(DEITZ et al., 2008; CAVICHIOLI; TAKIYA, 2012). Cicadellidae se constitui em uma das dez maiores famílias de insetos, com aproximadamente 22.000 espécies descritas, distribuídas em mais de 50 subfamílias (NIELSON, 1985; DEITZ et al., 2008). As espécies de grande parte das subfamílias se alimentam no floema das plantas, com exceção dos representantes de Cicadellinae, que sugam o xilema, e Typhlocybinae, que se alimentam do conteúdo de células da planta (CAVICHIOLI; TAKIYA, 2012). A alimentação das espécies dessa família muitas vezes causa injúrias nas folhas e ramos, podendo provocar danos severos em diversas plantas cultivadas. Entretanto, prejuízo maior é causado por aquelas que são capazes de transmitir agentes causadores de doenças (vírus, bactérias e mollicutes), havendo mais de 150 espécies de Cicadellidae que são vetores desses agentes em plantas cultivadas (NIELSON, 1985; DEITZ et al., 2008; ZAHNISER; DIETRICH, 2013).

Os representantes da família Delphacidae se caracterizam por apresentarem um esporão móvel no final das tíbias das pernas posteriores (Figura 1B). Essa família conta com 2.113 espécies descritas no planeta (BOURGOIN, 2014), sendo que, para o Brasil, não existem estimativas do número de espécies (CAVICHIOLI; TAKIYA, 2012). Os Delphacidae estão frequentemente associados a monocotiledôneas. Algumas espécies são vetores de agentes causadores de doenças e são consideradas pragas importantes em culturas como trigo, arroz, milho e cevada (O'BRIEN; WILSON, 1985).

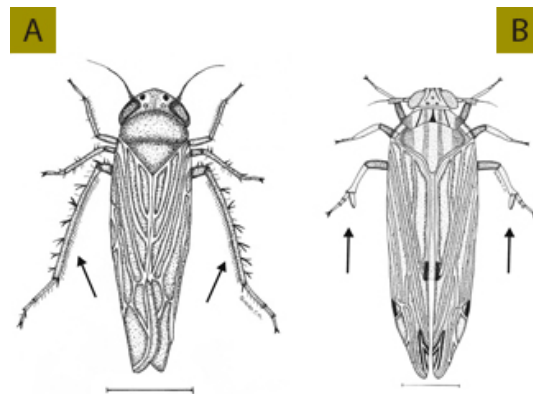


Figura 1. Representante de Cicadellidae (*Dalbulus maidis* – setas indicam presença de fileira de espinhos na tíbia posterior) (A); representante de Delphacidae (*Peregrinus maidis* – setas indicam presença de esporão móvel no final da tíbia posterior) (B).

Ilustração: Charles Martins de Oliveira

Diversidade de espécies de cigarrinhas em milho no Brasil

A diversidade de cigarrinhas tem sido estudada de forma eficiente por meio da utilização de coletas com rede entomológica. Nas pesquisas realizadas em milho no Brasil, essa metodologia tem sido utilizada (LOPES; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2013). Nesses estudos, as amostras foram compostas por três subamostras em cada local de coleta. Cada subamostra foi coletada efetuando-se

30 movimentos de rede dentro das áreas de cultivo milho, as cigarrinhas foram mortas e acondicionadas em frascos com álcool 70% e posteriormente foram identificadas em nível específico (LOPES; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2013).

Entre os anos de 1999 e 2001 foram realizadas coletas de cigarrinhas (apenas Cicadellidae) em milho no Brasil na região Sudeste, nos estados de São Paulo e Minas Gerais e na região Centro-Oeste, no Estado de Goiás (Tabela 1; Figura 2) (LOPES; OLIVEIRA, 2004). Entre os anos de 2005 e 2007, as coletas foram realizadas nas regiões Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro--Oeste (Goiás), Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e Nordeste (Maranhão e Piauí) (Tabela 1; Figura 2) (OLIVEIRA et al., 2013).

Tabela 1. Localidades de coleta de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae e Delphacidae), em milho no Brasil.

Região	Localidade	Abreviação	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)	Referência
Centro-Oeste	Itumbiara, GO	It	18° 7'8,1"	49°14'46,2"	608	Oliveira et al. (2013)
	Montividiu, GO	Mt				Lopes e Oliveira (2004)
	Rio Verde, GO	Rv				Lopes e Oliveira (2004)
	Santa Helena, GO	Sh				Lopes e Oliveira (2004)
	Vicentinópolis, GO	Vc				Lopes e Oliveira (2004)
Nordeste	Balsas, MA	Bl	7°34'22,5"	45°57'43,2"	299	Oliveira et al. (2013)
	Baixa Grande do Ribeiro, PI	Br	7°49'2,5"	45° 2'26,1"	430	Oliveira et al. (2013)
	São Raimundo das Mangabeiras, MA	Sr	6°59'21,8"	45°25'58,6"	297	Oliveira et al. (2013)
	Tasso Fragoso, MA	Tf	8°29'46,0"	45°46'38,8"	285	Oliveira et al. (2013)
	Vargem Limpa, MA	VI	7°38'24,2"	46°20'54,3"	378	Oliveira et al. (2013)
Sudeste	Alpinópolis, MG	Ap	20°52'38,4"	46°22'17,6"	863	Oliveira et al. (2013)
	Araxá, MG	Ar	19°34'31,3"	47° 0'12,0"	976	Oliveira et al. (2013)
	Ingaí, MG	Ig	21°24'13,3"	44°55'43,2"	943	Oliveira et al. (2013)
	Lavras, MG	La	21°12'38,8"	45° 3'31,9"	910	Oliveira et al. (2013)
	Luz, MG	Lu	19°47'27,7"	45°38'17,5"	647	Oliveira et al. (2013)
	Nova Ponte, MG	Np	19°10'38,6"	47°41'20,4"	946	Oliveira et al. (2013)
	Pimenta, MG	Pi	20°27'56,1"	45°48'8,9"	811	Oliveira et al. (2013)
	Pouso Alegre, MG	Pa	22°15'15,7"	45°52'54,2"	872	Oliveira et al. (2013)
	Santa Juliana, MG	Sj	19°51'52,1"	47°28'22,2"	894	Oliveira et al. (2013)
	São Gonçalo do Sapucaí, MG	Ss	21°54'6,7"	45°37'43,4"	873	Oliveira et al. (2013)
	São Sebastião da Bela Vista, MG	Sv	22° 8'7,1"	45°44'59,5"	851	Oliveira et al. (2013)
	Sete Lagoas, MG	SL				Lopes e Oliveira (2004)
	Três Corações, MG	Tc	21°39'16,7"	45°18'57,4"	919	Oliveira et al. (2013)
	Uberlândia, MG	Ub	19°11'17,1"	48° 9'27,7"	908	Oliveira et al. (2013)
Sudeste	Altinópolis, SP	At	21° 0'51,2"	47°20'13,1"	857	Oliveira et al. (2013)
	Assis, SP	As				Lopes e Oliveira (2004)
	Capão Bonito, SP	Cb				Lopes e Oliveira (2004)
	Jardinópolis, SP	Jd				Lopes e Oliveira (2004)
Sul	Apucarana, PR	Ac	23°33'50,2"	51°31'55,1"	820	Oliveira et al. (2013)
	Barracão, PR	Ba	26°12'32,6"	53°38'11,1"	721	Oliveira et al. (2013)
	Boa Vista das Missões, RS	Bm	27°38'44,6"	53°19'41,4"	580	Oliveira et al. (2013)
	Cambe, PR	Ca	23°15'31,6"	51°15'42,0"	608	Oliveira et al. (2013)
	Cafelândia, PR	Cf	24°38'46,5"	53°17'55,7"	605	Oliveira et al. (2013)
	Campo Mourão, PR	Cm	23°59'29,2"	52°21'17,3"	547	Oliveira et al. (2013)
	Capanema, PR	Cn	25°41'51,8"	53°46'32,8"	391	Oliveira et al. (2013)
	Cornélio Procópio, PR	Cp	23° 9'58,9"	50°36'42,0"	574	Oliveira et al. (2013)
	Cunha Porã, SC	Cu	26°52'43,7"	53°10'12,3"	529	Oliveira et al. (2013)
	Frederico Westphalen, RS	Fw	27°22'44,0"	53°24'1,7"	566	Oliveira et al. (2013)
	Guaraciaba, SC	Gr	26°34'54,1"	53°31'17,9"	653	Oliveira et al. (2013)

Região	Localidade	Abreviação	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)	Referência
Sul	Guarujá do Sul, SC	Gs	26°23'28,6"	53°31'10,9"	704	Oliveira et al. (2013)
	Irani, SC	In	26°59'51,4"	51°52'24,4"	1114	Oliveira et al. (2013)
	Iraceminha, SC	Ir	26°49'36,3"	53°15'57,0"	446	Oliveira et al. (2013)
	Jurandá, PR	Ju	24°24'47,4"	52°49'4,1"	599	Oliveira et al. (2013)
	Lapa, PR	Lp	25°45'28,6"	49°44'35,9"	941	Oliveira et al. (2013)
	Maringá, PR	Ma	23°21'0,7"	51°53'58,0"	494	Oliveira et al. (2013)
	Mandaguari, PR	Md	23°30'46,9"	51°42'45,8"	710	Oliveira et al. (2013)
	Nova Erechim, SC	Ne	26°53'39,1"	52°55'16,4"	509	Oliveira et al. (2013)
	Passo Fundo, RS	Pf	28° 8'20,3"	52°17'24,1"	696	Oliveira et al. (2013)
	Pulador, RS	Pu	28°29'26,8"	52°33'6,4"	515	Oliveira et al. (2013)
	Santo Antônio do Sudoeste, PR	As	26° 4'38,1"	53°42'41,5"	564	Oliveira et al. (2013)
	São José do Cedro, SC	Sc	26°28'3,7"	53°30'12,7"	735	Oliveira et al. (2013)
	Santa Mariana, PR	Sm	23° 8'59,4"	50°32'9,3"	483	Oliveira et al. (2013)
	São Miguel do Oeste, SC	So	26°41'41,3"	53°31'1,6"	667	Oliveira et al. (2013)
	Santa Tereza do Oeste, PR	Sz	25° 1'35,3"	53°34'33,4"	723	Oliveira et al. (2013)
	São Mateus do Sul, PR	St	25°54'20,4"	50°26'41,0"	788	Oliveira et al. (2013)
	Toledo, PR	To	24°39'0,2"	53°44'55,2"	529	Oliveira et al. (2013)

Fonte: Lopes e Oliveira (2004) e Oliveira et al. (2013).



Figura 2. Mapa indicando as localidades de coleta de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae e Delphacidae), em milho, no Brasil (para as abreviações ver Tabela 1).

Fonte: adaptado de Lopes e Oliveira (2004); Oliveira et al. (2013).

Nesses estudos, foram coletados 4.804 espécimes de cigarrinhas (Cicadellidae e Delphacidae) pertencentes a 44 espécies. Deste total, 4.599 (95,7%) espécimes pertenciam à família Cicadellidae, representada por 35 espécies, e 205 espécimes de Delphacidae, pertencentes a nove espécies (Tabelas 2, 3 e 4) (LOPES; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2013). Os representantes das famílias Cicadellidae e Delphacidae apresentam ampla distribuição geográfica (NIELSON, 1985; O'BRIEN; WILSON, 1985). Esse fato é evidenciado pelo registro de representantes de ambas as famílias em todos os estados brasileiros amostrados, com exceção de São Paulo, onde se coletou apenas Cicadellidae. Estudos da fauna de Cicadellidae em milho, na América do Sul, foram conduzidos apenas na Argentina, e apontaram entre 25 e 35 espécies de Cicadellidae (PARADELL, 1995; PARADELL et al., 2001; LUFT ALBARRACIN et al., 2008) das quais *D. maidis*, *Agalliana ensigera* Oman, *Amplipcephalus dubius* (Linnavuori), *Chlorotettix fraterculus* (Berg), *Empoasca curveola* Oman, *Exitianus obscurinervis* (Stål), *Haldorus sexpunctatus* (Berg), *Hortensia similis* (Walker), *Copididonus hyalinipennis* (Stål), *Planicephalus flavicosta* (Stål), *Balclutha incisa* (Matsumura), *Stirellus picinus* (Berg), *Unerus colonus* (Uhler), *Scopogonalia subolivacea* (Stål) e *Curtara pagina* DeLong e Freytag, registradas por Paradell et al. (2001) e Luft Albarracin et al. (2008), coincidem com as espécies encontradas no Brasil. Em relação aos Delphacidae, estudos no Uruguai apontaram a presença de quatro espécies (REMES LENICOV et al., 2000) e na Argentina, o registro de 11 espécies (REMES LENICOV; VIRLA, 1999). A espécie *Toya propinqua* (Fieber), registrada no Uruguai e na Argentina, e *Sogatella kolophon* (Kirkaldy) e *Peregrinus maidis* (Ashmead), observadas na Argentina, também coincidem com as espécies encontradas em milho no Brasil.

As 12 espécies mais abundantes representaram 97,5% de todos os Cicadellidae e Delphacidae coletados e foram: *D. maidis* (n = 4.239), *S. kolophon* (n = 74), *U. colonus* (n = 59), *Rotigonalia limbatula* (Osborn) (n = 53), *Agalliinae* sp. 1 (n = 52), *P. flavicosta* (n = 41), *Tagosodes cubanus* (Crawford) (n = 41), *Pyrophagus tigrinus* Remes Lenicov & Varela (n = 36), *B. incisa* (n = 32), *Agallia albidula* Uhler (n = 22), Delphacidae sp. 1 (n = 21) e *Atanus declivatus* Linnavuori (n = 15) (LOPES; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2013).

Tabela 2. Número médio de cigarrinhas (Cicadellidae) por amostra, coletadas com rede entomológica em lavouras de milho em Minas Gerais, São Paulo e Goiás, entre 1999 e 2001.

Espécie	1999-2001(1)		
	MG	SP	GO
<i>Agalliinae</i> sp. 1	0,00	2,00	5,00
<i>Balclutha hebe</i>	0,00	0,67	0,38
<i>Dalbulus maidis</i>	3,50	5,83	25,38
<i>Ferrariana trivittata</i>	0,00	0,00	0,25
<i>Scopogonalia subolivacea</i>	0,00	0,17	0,00
<i>Unerus colonus</i>	0,00	0,00	7,38
Média/estado	3,50	8,67	38,38
Média/ano		22,88	

Fonte: adaptado de Lopes e Oliveira (2004).

Espécie	2005						2006									
	MA	GO	MG	PR	SC	RS	MA	GO	SP	MG	PR	SC	RS	MA	PI	GO
<i>Rotigonalia limbatula</i>	0,12	1,00	0,33	0,00	0,20	0,00	0,00	1,64	1,00	0,00	0,10	0,20	0,00	0,00	0,00	1,90
<i>Scopogonalia subolivacea</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Sibovia sagata</i>	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Stirellus picinus</i>	0,04	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Unerus colonus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Unerus</i> sp. 1	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,10
Typhlocibinae sp. 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00
Média/estado	2,69	12,78	3,00	6,20	9,00	4,50	1,10	210,91	4,00	4,50	13,57	33,40	74,08	0,83	0,50	8,20
Média/ano	5,54						51,33									

Fonte: adaptado de Oliveira et al. (2013).

Tabela 4. Número médio de cigarrinhas (Delphacidae) por amostra, coletadas com rede entomológica em lavouras de milho em diversos estados brasileiros, entre 2005 e 2007.

Espécie	2005						2006							2007				
	MA	GO	MG	PR	SC	RS	MA	GO	SP	MG	PR	SC	RS	MA	PI	GO	MG	PR
<i>Caenodelphax teapae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Delphacidae sp.1	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,33	0,00
Delphacidae sp.2	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00
<i>Delphacodes saxicola</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Peregrinus maidis</i>	0,04	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pyrophagus tigrinus</i>	0,35	0,22	0,33	0,13	0,00	0,00	0,05	0,55	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,08	1,75	0,20	0,17	0,07
<i>Sogatella kolophon</i>	1,23	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,91	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	1,00	1,50	0,00	0,17	0,00
<i>Tagosodes cubanus</i>	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Toya propinqua</i>	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
Média/estado	2,31	0,67	0,50	0,13	0,00	0,00	2,50	3,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	1,92	3,75	0,20	0,67	0,07
Média/Ano	1,06						1,21							0,80				

Fonte: adaptado de Oliveira et al. (2013).

Principais espécies vetores em milho no Brasil: identificação, distribuição e abundância

Além dos estudos de diversidade de cigarrinhas em milho realizados entre 1999 e 2007 (OLIVEIRA; LOPES, 2004; OLIVEIRA et al., 2013), mais recentemente, entre os anos de 2008 e 2010, foram realizadas coletas de cigarrinhas em milho nas regiões Centro-Oeste (Goiás), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (Tabela 5), e entre os anos de 2012 e 2014, foram realizadas coletas de cigarrinhas em milho na região Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe) para verificar a presença dos principais vetores de agentes causais de doenças em diferentes regiões produtoras do Brasil (Tabela 6)

Tabela 5. Localidades de coleta de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae e Delphacidae) em milho nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, entre 2008 e 2010*.

Estado	Localidade	Latitude	Longitude	Altitude
Goiás	Campo Alegre de Goiás	17° 21' 15,6"	47° 47' 26,0"	953
	Cristalina	16° 32' 09, 0"	47° 37' 47,0"	951
Minas Gerais	Frutal	19° 57' 47,1"	48° 59' 21,4"	568
	Prata	19° 29' 16,7"	48° 51' 34,4"	650
São Paulo	Tarabai	22° 20' 55,3"	51° 33' 26,5"	372
	Braúna	21° 30' 08,6"	50° 15' 39,2"	425
Paraná	Engenheiro Beltrão	23° 42' 39,6"	52° 09' 41,7"	349
	Ubiratã	24° 32' 57,9"	53° 02' 08,8"	458
	Pranchita	25° 51' 51,1"	53° 44' 40,4"	421
	Bom Jesus do Sul	26° 11' 27,4"	53° 39' 17,0"	717
	Santa Lúcia	25° 24' 31,8"	53° 34' 18,8"	421
	Santa Tereza do Oeste	25° 09' 35,3"	53° 35' 41,5"	744
	Juranda	24° 20' 16,3"	52° 42' 01,0"	659
	Maringá	23° 17' 59,7"	51° 53' 31,4"	388
Santa Catarina	Guarujá do Sul	26° 24' 19,7"	53° 31' 27,5"	721
	Guaraciaba	26° 33' 40,3"	53° 30' 32,6"	722
	São Miguel do Oeste	26° 48' 37,3"	53° 26' 19,4"	488
	Palmitos	27° 06' 18,4"	53° 12' 44,4"	432
	Taquaruçu do Sul	27° 24' 45,2"	53° 24' 58,9"	552
Rio Grande do Sul	Tenente Portela	27° 22' 22,6"	53° 46' 41,8"	487
	Três de Maio	27° 41' 14,5"	54° 09' 08,4"	186
	Porto Vera Cruz	27° 48' 38,2"	54° 47' 07,3"	315
	Porto Xavier	27° 53' 48,6"	55° 05' 18,6"	128
	Porto Lucena	27° 52' 16,9"	55° 00' 42,8"	153
	Santo Cristo	27° 50' 29,5"	54° 39' 49,3"	310
	Santa Rosa	27° 50' 06,5"	54° 25' 47,3"	329
Vista Alegre	27° 22' 18,0"	53° 29' 25,1"	537	

Dalbulus maidis

A cigarrinha-do-milho, *D. maidis*, é responsável pela transmissão de mollicutes (*S. kunkelii* e fitoplasma), causadores dos enfezamentos pálido e vermelho, e de um vírus (*Maize rayado fino virus*)

em milho, doenças responsáveis por grandes perdas econômicas em cultivos comerciais (MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; OLIVEIRA, 2002b, 2003b). Os três patógenos, embora muito distintos taxonomicamente, coabitam os vasos do floema do milho, são transmitidos de forma semelhante e têm distribuição geográfica comum (LOPES; OLIVEIRA, 2004).

Os representantes dessa espécie são insetos diminutos, com cerca de 3,7 mm a 4,3 mm de comprimento, sendo as fêmeas geralmente maiores que os machos. Os adultos têm coloração amarelo-palha (Figura 3A). Contudo, em algumas regiões, os espécimes podem ser mais claros ou mais escuros, em função do clima. Os machos apresentam o abdome com coloração amarela, diferenciando-se do tórax e da cabeça, que são mais opacos. Na fêmea, a coloração é homogênea em todo corpo. Os adultos possuem dois pares de asas transparentes com nervuras distribuídas longitudinalmente no comprimento das asas, ambos se estendendo um pouco além do abdome. Seu aparelho bucal é do tipo sugador labial com três segmentos. As antenas são setáceas com filamento apical. Os insetos dessa espécie apresentam fileiras de pequenos espinhos nas tíbias das pernas posteriores, característica da família Cicadellidae (Figura 1A), e duas manchas circulares negras bem marcadas na cabeça, entre os olhos compostos. Esses insetos são muito ágeis, abandonando a planta ao menor distúrbio; geralmente se encontram no cartucho das plantas de milho, em número variável, dependendo da idade da planta e época do ano. A correta identificação da espécie é baseada no formato do sétimo esternito abdominal da fêmea e principalmente na morfologia dos componentes da genitália masculina.

Distribuição

A cigarrinha-do-milho ocorre nas Américas, estando presente do sul dos EUA até as regiões temperadas na Argentina (OMAN, 1948; TRIPLEHORN; NAULT, 1985; NAULT, 1990; CARLONI et al., 2013). No Brasil, levando-se em consideração todos os estudos realizados até o momento com *D. maidis*, essa espécie já foi registrada em 143 municípios pertencentes a 17 estados (AL, BA, CE, MA, PA, PE, PI, RN, SE, MG, SP, RJ, GO, MS, PR, SC e RS) e no Distrito Federal (MENDES, 1938; COSTA, 1957; SILVA et al., 1968; COSTA et al., 1971; WAQUIL, 1997; OLIVEIRA et al., 1998, 2002a, 2003a, 2004, 2007, 2013; BASTOS et al., 2003; FRIZZAS et al., 2003; CRUZ et al., 2008; MARTINS et al., 2008; ÁVILA; ARCE, 2008; SILVA, 2008; SILVA et al., 2009; CAMBRUZZI et al., 2013; JUSTINIANO et al., 2014), não sendo relatada apenas no Norte, muito provavelmente por falta de estudos nesta região do País.

Em levantamentos recentes realizados no Centro-Sul do País (2008 a 2010), a cigarrinha *D. maidis* esteve presente em 100% dos municípios avaliados (Tabela 5), e na região Nordeste (2012 a 2014) foi registrada em todos os estados da região e em 49 dos 80 municípios amostrados, o que representou 61,2% (Tabela 6).

Tabela 6. Localidades de coleta de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae e Delphacidae), em milho na região Nordeste do Brasil, entre 2012 e 2014.

Estado	Localidade	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)
Alagoas	São Miguel	09° 59' 33,7"	36° 35' 28,8"	152
	São Sebastião	09° 55' 25,8"	36° 32' 30,3"	222
Bahia	Adustina	10° 35' 05,4"	38° 05' 01,9"	237
	Araci	11° 20' 55,1"	38° 54' 40,4"	223
	Coronel João Sá	10° 18' 28,8"	37° 45' 02,9"	371
	Paripiranga	10° 39' 33,8"	37° 59' 58,3"	448
	Ararendá	04° 45' 07,3"	40° 52' 23,7"	683
	Crateús	05° 03' 19,7"	40° 33' 06,4"	295
	Crato	07° 13' 59,1"	39° 22' 12,9"	219
	Guaraciaba	04° 08' 04,3"	40° 49' 53,7"	919
	Ibicuitinga	05° 00' 20,6"	38° 33' 16,8"	155
	Ipú	04° 18' 21,9"	40° 44' 12,0"	673
Ceará	Ipueiras	04° 30' 02,0"	40° 42' 54,2"	217
	Nova Olinda	07° 05' 54,3"	39° 40' 32,6"	407
	Nova Russas	04° 48' 42,8"	40° 32' 23,9"	333
	Poranga	04° 44' 14,9"	40° 55' 52,0"	750
	São Benedito	03° 59' 44,6"	40° 53' 00,8"	896
	Tianguá	03° 42' 25,6"	41° 05' 08,1"	799
	Viçosa	03° 36' 28,4"	41° 15' 56,4"	673
	Araioses	03° 03' 54,7"	41° 59' 52,2"	24
	Brejo	03° 40' 57,5"	42° 56' 11,2"	101
	Brejo	03° 40' 18,2"	42° 50' 41,9"	96
Maranhão	Buriti	03° 47' 22,4"	42° 57' 18,3"	114
	Caxias	04° 55' 13,8"	43° 21' 01,2"	162
	Chapadinha	03° 42' 29,3"	43° 11' 10,8"	115
	Nina Rodrigues	03° 34' 52,1"	43° 39' 43,9"	76
	São Bernardo	03° 17' 58,2"	42° 23' 32,7"	25
	Juazeirinho	07° 04' 16,1"	36° 36' 40,3"	582
	Patos	07° 00' 04,0"	37° 12' 20,0"	270
Paraíba	São Vicente do Seridó	06° 55' 52,7"	36° 23' 16,7"	641
	Soledade	07° 02' 04,9"	36° 21' 50,0"	550
	Souza	06° 43' 19,3"	38° 18' 35,9"	231
Pernambuco	Araripina	07° 29' 34,9"	40° 35' 07,8"	650
	Boa Vista	07° 09' 59,9"	36° 08' 32,2"	580
Pernambuco	Custódia	08° 05' 04,2"	37° 33' 14,8"	510
	Flores	08° 01' 57,0"	37° 57' 56,5"	531
	Ouricuri	07° 49' 01,2"	40° 09' 55,2"	482
	Sertânia	07° 58' 42,6"	37° 12' 51,2"	607
	Verdejantes	08° 00' 26,0"	38° 55' 15,4"	512
Piauí	Água Branca	05° 52' 49,3"	42° 38' 23,3"	278
	Altos	05° 06' 11,2"	42° 24' 02,7"	148

Estado	Localidade	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)
	Alvorada do Gurgueia	08° 25' 52,8"	43° 53' 15,5"	207
	Bom Jesus	09° 18' 50,3"	44° 31' 17,4"	259
	Buriti dos Lopes	03° 06' 08,1"	41° 48' 39,4"	7
	Campo Maior	04° 47' 22,0"	42° 13' 13,6"	125
	Canto do Buriti	08 07' 12,9"	42° 56' 15,3"	314
	Cocal de Telha	04° 31' 56,8"	41° 57' 55,8"	161
	Eliseu Martins	08° 07' 57,5"	43° 33' 34,5"	317
	Francisco Santos	07° 06' 48,1"	41° 12' 34,6"	440
	Itainópolis	07° 31' 09,9"	41° 29' 29,6"	282
	Manuel Emídio	08° 05' 51,2"	43° 48' 18,9"	280
	Miguel Alves	04° 14' 38,9"	42° 54' 00,8"	72
	Nazaré do Piauí	06° 57' 54,1"	42° 40' 20,2"	374
	Passagem Franca	05° 51' 47,3"	42° 25' 46,2"	162
	Pedro II	04° 26' 44,1"	41° 33' 19,4"	157
	Picos	07° 02' 27,9"	41° 32' 47,6"	437
	Piripiri	04° 20' 52,3"	41° 48' 19,3"	158
	São João do Piauí	08° 20' 22,1"	42° 16' 50,2"	222
	Simplício Mendes	07° 50' 02,4"	41° 53' 23,5"	283
	Teresina	05° 02' 11,9"	42° 47' 12,7"	106
	União	04° 37' 09,9"	42° 50' 13,8"	67
Vila Nova do Piauí	07° 11' 48,8"	40° 53' 50,6"	388	
Rio Grande do Norte	Baraúna	05° 02' 42,2"	37° 41' 09,2"	100
	Governador Dix-Sept Rosado	05° 18' 05,1"	37° 33' 31,3"	88
	Luis Gomes	06° 26' 15,8"	38° 21' 07,6"	318
	São Francisco do Oeste	06° 01' 54,8"	38° 11' 21,4"	183
Sergipe	Carira	10° 19' 04,0"	37° 41' 54,5"	337
	Frei Paulo	10° 30' 49,4"	37° 38' 57,9"	204
	Graco Cardoso	10° 14' 18,5"	37° 12' 16,3"	236
	Itabaiana	10° 38' 20,7"	37° 22' 08,2"	158
	Lagarto	10° 58' 44,8"	37° 34' 58,7"	157
	Lagoa do Rancho	10° 00' 10,8"	37° 27' 31,1"	291
	Monte Alegre	10° 02' 29,0"	37° 33' 26,3"	237
	Nossa Senhora da Glória	10° 12' 47,9"	37° 19' 07,1"	262
	Nossa Senhora das Dores	10° 27' 56,8"	37° 11' 39,8"	204
	Pedra Mole	10° 36' 58,4"	37° 41' 33,2"	162
	Pinhão	10° 34' 00,6"	37° 43' 01,8"	246
	Poço Redondo	09° 44' 06,6"	37° 45' 49,0"	211
Poço Verde	10° 44' 46,4"	38° 02' 05,3"	392	
Simão Dias	10° 46' 21,4"	37° 57' 02,3"	326	

Abundância

Em estudos realizados em municípios das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, *D. maidis* representou 90,1% de todas as cigarrinhas (Cicadellidae e Delphacidae) coletadas e esteve presente em 64,1% (n = 127) das amostras (Tabelas 2 e 3) (OLIVEIRA; LOPES, 2004; OLIVEIRA et al., 2013). No Centro-Sul, entre os anos de 2008 e 2010, representou 35,5% das cigarrinhas e esteve presente em 88,3% das amostras; e no Nordeste, entre 2012 e 2014, representou 29,4% das cigarrinhas e esteve presente em 61,2% das amostras coletadas. Em outros levantamentos realizados no Brasil esta espécie representou 74% dos Cicadellidae coletados em 17 localidades de quatro regiões do País (OLIVEIRA et al., 2004). Esses resultados confirmam a condição desta espécie como o principal vetor de fitopatógenos causadores de doenças em milho, no Brasil.

Observou-se diferença na abundância desta espécie em relação às datas das coletas. Por exemplo, na região Centro-Sul (Centro-Oeste, Sul e Sudeste) do País, no ano de 2006 foram coletados 89,8% dos espécimes e só o Estado de Goiás foi responsável por 56,8% do total de *D. maidis* coletado. No Nordeste, observou-se maior incidência desta espécie no ano de 2005, quando foram coletados 92,3% dos espécimes, e uma baixa incidência nos anos de 2006 e 2007 (OLIVEIRA et al., 2013). Diferenças na abundância também ocorrem em função da idade das plantas e da época do ano. No estado do Piauí e em Minas Gerais, menores abundâncias de *D. maidis* foram observadas na safra de verão e as maiores ocorreram no milho irrigado (MENESES, 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

O ambiente, principalmente as condições climáticas, pode exercer forte influência na população de cigarrinhas (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003; OLIVEIRA et al., 2004), aumentando ou reduzindo o número de gerações (MARÍN, 1987; WAQUIL et al., 1999), influenciando diretamente a abundância dessa espécie. Especula-se que a influência do clima sobre a população de *D. maidis*, além de diferenças morfológicas e genéticas observadas para populações dessa cigarrinha nas regiões Nordeste e Centro-Sul do Brasil (OLIVEIRA et al., 2004, 2007), pode resultar em variações na incidência dos enfezamentos em plantios sucessivos de milho (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003).

Peregrinus maidis

O vetor *P. maidis* é considerado uma praga importante na cultura do milho e do sorgo (SINGH; SEETHARAMA, 2008), sendo responsável pela transmissão de vários fitopatógenos causadores de doenças em milho como *Maize mosaic virus*, *Maize stripe virus* e *Maize line virus* (SINGH; SEETHARAMA, 2008). Esta espécie também foi capaz de transmitir para o milho, de forma experimental, o *Mal de Río Cuarto virus* (VIRLA et al., 2004; GIMÉNEZ PECCI et al., 2012).

Os adultos de *P. maidis* apresentam duas formas: macrópteros e braquípteros (Figura 3B). As formas macrópteras (ou aladas) apresentam asas completamente desenvolvidas e medem cerca de 2,7 mm, sendo as fêmeas maiores que os machos. Apresentam coloração geral marrom-escuro, sendo a cabeça e tórax amarelados, com faixas longitudinais de cor marrom-claro. Possuem dois pares de asas translúcidas que apresentam diversas manchas escuras e nervação proeminente, e, quando comparadas com as de *D. maidis*, estendem-se bem além do final do abdome. As formas braquípteras (de asas curtas) medem cerca de 3,4 mm, no caso das fêmeas, e 2,4 mm, os machos. A coloração é semelhante à das formas aladas, porém, os segmentos abdominais são bem escuros com bordos branco-amarelados. As asas são curtas e atingem apenas o 5º segmento abdominal, apresentando coloração marrom homogênea. Em ambas as formas, o aparelho bucal é trisegmentado e do tipo sugador labial. As antenas são setáceas, com filamento apical. Possuem escapo e pedicelo extremamente desenvolvidos e situam-se lateralmente, abaixo dos olhos compostos. Os insetos dessa espécie apresentam um grande esporão móvel no ápice das tíbias das pernas posteriores,

característica da família Delphacidae (Figura 1B). São menos ágeis que *D. maidis* e são encontrados em toda a planta de milho, mas, preferencialmente, na junção da bainha da folha com o colmo, e não raramente são associados a formigas. A identificação taxonômica da espécie é baseada nos caracteres da genitália masculina.

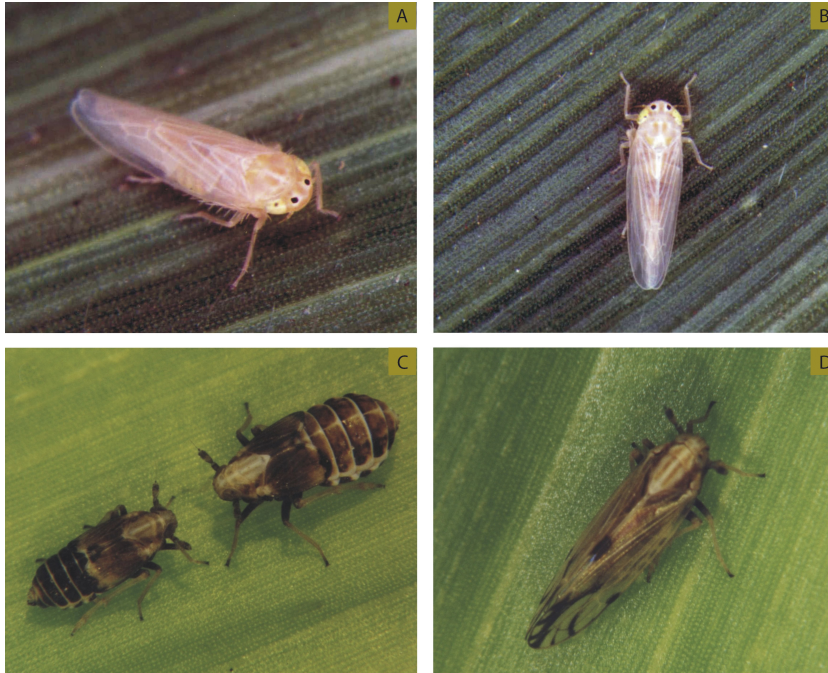


Figura 3. Principais vetores de fitopatógenos em milho no Brasil. Adultos de *Dalbulus maidis* (A e B) e adultos de *Peregrinus maidis*: braquípteros (C) e macróptero (D).

Fotos: Charles Martins de Oliveira

Distribuição

O delfacídeo *P. maidis* apresenta distribuição pantropical (SINGH; SEETHARAMA, 2008). No Brasil, até o momento, essa espécie já foi relatada em 26 municípios e em 12 estados (AL, CE, GO, MA, MG, PR, PB, PE, PI, RN, SP e SE) (COSTA et al., 1971; LEÃO VEIGA, 1977; WAQUIL, 1997; FRIZZAS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013). Nos levantamentos realizados no Centro-Sul, entre os anos de 2008 e 2010, não foi constatada a presença de *P. maidis* nas amostras, e, no Nordeste, entre 2012 e 2014, esteve presente em 21 municípios.

Abundância

Referida no Brasil, juntamente com a cigarrinha *D. maidis* e o pulgão *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae), como uma das principais espécies vetoras de fitopatógenos causadores de doenças em milho (LOPES; OLIVEIRA, 2004), ocorreu apenas nos estados do Maranhão (81,8% dos espécimes coletados), Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Tabela 4) e com baixa prevalência nos três anos de coleta (OLIVEIRA et al., 2013). Mais recentemente, no Nordeste, entre 2012 e 2014, essa espécie representou 4,4% das cigarrinhas (Cicadellidae e Delphacidae) e 16,5% dos Delphacidae coletados nesta região do País, estando presente em 26,2% das amostras. Entretanto, na região

Centro-Sul, em três anos de coleta (2008, 2009 e 2010) não foi observada a presença de *P. maidis*. Esses resultados sugerem que *P. maidis*, assim como os representantes de Delphacidae, são mais abundantes na região Nordeste, quando comparada ao Centro-Sul.

Outras espécies vetores e potenciais vetores de fitopatógenos

Vetores de fitopatógenos em milho

Além de *D. maidis* e *P. maidis* outras espécies vetores de fitopatógenos foram registradas nos estudos realizados em milho no Brasil (OLIVEIRA et al., 2013).

A cigarrinha *P. flavicosta* (Cicadellidae), já registrada em vários estados brasileiros (CAVICHIOLI; ZANOL, 1991) e em diversos hospedeiros, é vetor de fitoplasmas (DABEK, 1982; ECKSTEIN, 2010) e do *Maize chlorotic dwarf waikavirus*, na cultura do milho (LOPES et al., 1994). Em mata atlântica (Minas Gerais) esta foi uma das espécies mais abundantes (COELHO, 1997). A espécie *P. flavicosta* foi observada no Maranhão, Goiás e Rio Grande do Sul (Tabelas 2 e 3). O cicadélídeo *E. obscurinervis* já foi registrado experimentalmente como vetor de *S. kunkelli*, na Argentina (CARLONI et al., 2011), e foi coletado em Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Tabelas 2 e 3).

O delfacídeo *Caenodelphax teapae* (Fowler) é o inseto-vetor de *Urochloa hoja blanca virus* em gramínea [*Urochloa plantaginea* (Link) RD Webster] (MIRANDA et al., 2001) e do *Mal de Río Cuarto* em milho, em condições experimentais (GIMÉNEZ PECCI et al., 2012). O *Mal de Río Cuarto* é uma doença ausente no Brasil, e de grande importância na Argentina, onde causa surtos epidêmicos com sérios prejuízos para a cultura do milho (LENARDÓN et al., 1998; ORNAGHI et al., 1999; TRUOL et al., 2001). Esse delfacídeo foi coletado também em Goiás e em Santa Catarina (Tabela 4). A espécie *P. tigrinus* (Delphacidae) foi observada em todas as regiões do País, com registros no Maranhão, Piauí, Goiás, Minas Gerais e Paraná (Tabela 4). Experimentalmente, esta espécie foi capaz de transmitir o vírus agente causal do *Mal de Río Cuarto*, em milho (VELAZQUEZ et al., 2006). Outro Delphacidae, a espécie *Toya propinqua* (Fieber), também foi capaz de transmitir o vírus causador do *Mal de Río Cuarto*, na Argentina (VELAZQUEZ et al., 2001; MATTIO et al., 2005), além de ser vetor de *Cynodon chlorotic streak virus* e, experimentalmente, transmitiu o vírus agente causal do *Maize rough dwarf virus* (HARPAZ, 1972). Esta espécie foi coletada em duas regiões do Brasil, no Centro-Oeste (Goiás) e no Nordeste (Maranhão) (Tabela 4). A espécie *S. kolophon* (Delphacidae), que apresenta ampla distribuição mundial (ASCHE; WILSON, 1990), é vetor de um rhabdovírus do capim-pangola [*Digitaria decumbens* Stent e *D. ciliaris* (Retz.) Koeler] (GREBER, 1979) e também foi capaz de transmitir experimentalmente, com baixa eficiência, o vírus causador de *Maize sterile stunt*, em milho (GREBER, 1982). Foi coletada no Maranhão, no Piauí, em Goiás, em Minas Gerais e no Paraná, sendo 78,4% dos espécimes coletados no Nordeste (Tabela 4).

Outros vetores

Além de espécies vetores de fitopatógenos que infectam o milho, Oliveira et al. (2013) registraram vetores de fitopatógenos que infectam outras espécies vegetais cultivadas, ocorrendo na cultura do milho, no Brasil.

A cigarrinha *A. albidula* (Cicadellidae), registrada em diversos estados brasileiros, é um vetor de vírus (*Tomato curly top virus*) na cultura do tomate (COELHO et al., 2001). Ocorreu nos estados do Centro-Sul do País (Goiás, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (Tabelas 2 e 3). A espécie *E. curveola* (Cicadellidae) relatada como portadora de fitoplasma que infecta plantas de beterraba no Chile (SALGADO, 2001), foi registrada nas regiões Nordeste (Maranhão e Piauí), Centro-Oeste (Goiás) e em todos os estados do Sul do País (Tabelas 2 e 3). As espécies *A. ensigera* e *Agalliana sticticollis* (Stål) (Cicadellidae), comuns em tomate, batatinha, algodão, trigo, fumo, beterraba e girassol, são vetores do vírus do broto crespo do tomateiro (*Curly top virus*) (COSTA, 1957; SILVA et al., 1968). A cigarrinha *A. sticticollis* (Cicadellidae) é relatada ainda como vetor de vírus em fumo (SILVA et al., 1968). As duas espécies foram registradas apenas no Sul do País, sendo *A. ensigera* coletada em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul e *A. sticticollis* no Paraná e em Santa Catarina (Tabelas 2 e 3). As espécies *Macugonalia leucomelas* (Walker) e *Ferrariana trivittata* (Signoret) (Cicadellidae), a primeira registrada em Santa Catarina e a segunda em Goiás (Tabelas 2 e 3), são comuns em plantas de citros, sendo vetores da bactéria *Xylella fastidiosa* agente causal da clorose variegada dos citros (CVC) (DESCOBERTOS..., 1999; MOLINA et al., 2010). Estudos têm demonstrado que a cigarrinha *Balclutha hebe* (Kirkaldy), coletada em brassicas, é capaz de portar um fitoplasma (ECKSTEIN et al., 2014), e em plantios de citros é portadora de um espiroplasma *Spiroplasma citri* Saglio et al. (KERSTING; SENGONCA, 1992). Esta espécie foi coletada nos estados de Goiás e São Paulo (Tabelas 2 e 3). O Delphacidae *T. cubanus* é vetor do vírus causador da *Hoja blanca* em arroz na América Central e do Sul (KING; SAUNDERS, 1984) e foi registrado nos estados do Maranhão e de Goiás, sendo 65,8% dos espécimes coletados no Maranhão (Tabela 4).

Diversidade de cigarrinhas em relação à distribuição geográfica

Oliveira et al. (2013) verificaram que Cicadellidae foi relativamente mais abundante do que a família Delphacidae, na região Centro-Sul do País, representando entre 94,3% e 99,0% dos espécimes coletados. Em contrapartida, na região Nordeste, a abundância de Delphacidae foi relativamente maior e variou de 45,1% a 76,0%. Essa diferença em abundância pode estar ligada, principalmente, a diferenças nas condições climáticas entre essas regiões, sobretudo no que diz respeito à temperatura e ao regime de chuvas.

Com relação à diversidade, registraram-se 39 espécies de cigarrinhas na cultura do milho, sendo 30 espécies de Cicadellidae e nove espécies de Delphacidae (Tabelas 2, 3 e 4). O maior número de espécies de Cicadellidae foi registrado no Centro-Sul, com 27 espécies, sendo 18 coletadas exclusivamente nessa região. No Nordeste, doze espécies foram coletadas, e três foram exclusivas (Tabelas 2 e 3). Para Delphacidae, foram registradas oito espécies no Nordeste e oito no Centro-Sul, e uma espécie foi exclusiva para cada uma das regiões (Tabela 4).

Considerações finais

Os estudos realizados no Brasil (LOPES; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2013) evidenciam que a diversidade de Cicadellidae e de Delphacidae na cultura do milho é comparável com a fauna dessas duas famílias em outros países da América do Sul (PARADELL, 1995; REMES LENICOV; VIRLA, 1999;

REMES LENICOV et al., 2000; PARADELL et al., 2001; LUFT ALBARRACIN et al., 2008). Muitas espécies que são vetores de agentes causais de doenças em plantas podem utilizar o milho, temporariamente, como hospedeiro. É importante considerar, contudo, o nível de especificidade dessas cigarrinhas em relação às espécies vegetais que podem ser hospedeiras para sua alimentação e reprodução, uma vez que apenas *D. maidis* se alimenta e se reproduz exclusivamente em milho no Brasil (OLIVEIRA; LOPES, 2004). As outras espécies de cigarrinhas encontradas podem, possivelmente, se alimentar também em milho, mas possuem outros hospedeiros preferenciais, sejam espécies vegetais cultivadas ou plantas-daninhas, que poderiam estar presentes nas imediações ou dentro das áreas cultivadas com milho, no momento da amostragem.

A presença de pelo menos oito espécies de cigarrinhas vetoras, ou potencialmente vetoras, de fitopatógenos responsáveis por doenças em milho (*D. maidis*, *P. flavicosta*, *C. teapae*, *E. obscurinervis*, *S. kolophon*, *P. tigrinus*, *T. propinqua* e *P. maidis*.), e das espécies *C. teapae*, *P. maidis*, *P. tigrinus* e *T. propinqua*, vetores, em condições experimentais, do *Mal de Río Cuarto virus*, alerta para os riscos que estes insetos representam para a cultura do milho, e requer medidas de monitoramento, dos vetores e dos fitopatógenos, para redução da possibilidade de disseminação de doenças, em lavouras de milho, e da entrada de doenças no País.

Referências

- ARAÚJO, W. S. D.; CUEVAS-REYES, P.; GUILHERME, F. A. G. Local and regional determinants of galling-insect richness in Neotropical savanna. **Journal of Tropical Ecology**, v. 30, n. 3, p. 269-272, 2014.
- ASCHE, M.; WILSON, M. R. The delphacid genus *Sogatella* and related groups: a revision with special reference to rice-associated species (Fulgoroidea). **Systematic Entomology**, v. 15, p. 1-42, 1990.
- ÁVILA, C. J.; ARCE, C. C. M. Flutuação populacional da cigarrinha-do-milho em duas localidades do Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1129-1132, 2008.
- BASTOS, C. S.; GALVÃO, J. C. C.; PICANÇO, M. C.; CECON, P. R.; PEREIRA, P. R. G. Incidência de insetos fitófagos e de predadores no milho e no feijão cultivados em sistema exclusivo e consorciado. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 391-397, 2003.
- BOURGOIN, T. **FLOW (Fulgoromorpha Lists on the Web)**: a knowledge and a taxonomy database dedicated to planthoppers (Insecta, Hemiptera, Fulgoromorpha, Fulgoroidea). Version: 8. 2014. Disponível em: <<http://www.hemiptera-databases.org/flow/?db=flow&page=home&lang=>>>. Acesso em: 2 mar. 2015.
- CAMBRUZZI, A. J.; SCHAINHUK, L.; VIGOLO, J.; BETEMPS, D. L. Levantamento de espécies de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae) no município de Laranjeiras do Sul, Paraná. **Anais do SEPE - Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS**, v. 3, n. 1, p. 1-2, 2013.
- CARLONI, E.; CARPANE, P.; PARADELL, S.; LAGUNA, I.; PECCI, M. G. Presence of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and of *Spiroplasma kunkelii* in the Temperate Region of Argentina. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 4, p. 1574-1581, 2013.
- CARLONI, E.; VIRLA, E.; PARADELL, S.; CARPANE, P.; NOME, C.; LAGUNA, I.; GIMENÉZ PECCI, M. P. *Extianus obscurinervis*: (Hemiptera: Cicadellidae) a new experimental vector of *Spiroplasma kunkelii*. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, p. 1793-1799, 2011.
- CAVICHIOLO, R. R.; TAKIYA, D. M. Subordem Auchenorrhyncha Duméril, 1806. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. (Ed.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. São Paulo: Holos, 2012. p. 359-368.
- CAVICHIOLO, R. R.; ZANOL, K. M. R. Espécies de Cicadellinae, Deltocephalinae (Homoptera, Cicadellidae) da Ilha de Maracá, Roraima. **Acta Amazônica**, v. 21, p. 55-61, 1991.
- CHOUDHURY, M. M.; ROSENKRANZ, E. Vector relationships of *Graminella nigrifrons* to maize chlorotic dwarf virus. **Phytopathology**, v. 73, p. 685-690, 1983.
- COELHO, L. B. N. **Análise faunística de Cicadellidae (Insecta: Homoptera) em área de mata atlântica**. 1997. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- COELHO, L. B. N.; SILVA, E. R.; FERREIRA, P. S. F. Registros novos e adicionais de Agallinae, Gyponinae e Nirvaniinae (Homoptera: Cicadellidae) para o Estado de Minas Gerais, Brasil. **Entomotropica**, v. 16, p. 131-135, 2001.
- COSTA, A. S. Alguns insetos e ácaros usados na transmissão de moléstias de vírus das plantas. **Bragantia**, v. 16, n. 4, p. 15-21, 1957.
- COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma do milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, p. 39-41, 1971.
- CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHAES, P. C. (Ed.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. p. 303-362.
- CRUZ, I.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; VIANA, P. A. Monitoramento de pragas e de inimigos naturais de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em área de plantio integrado de milho braquiária. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 27.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 3.; WORKSHOP SOBRE MANEJO E ETIOLOGIA DA MANCHA BRANCA DO MILHO, 2008, Londrina. **Agroenergia, produção de alimentos e mudanças climáticas: desafios para milho e sorgo: trabalhos e palestras**. [Londrina]: IAPAR; [Sete Lagoas]: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 1 CD-ROM.
- DABEK, A. J. Transmission experiments on coconut lethal yellowing disease with *Deltocephalus flavicosta* Stål, a leafhopper vector of periwinkle phylloidy in Jamaica. **Journal of Phytopathology**, v. 103, p. 103-109, 1982.
- DEITZ, L. L.; ALVAREZ, P. A.; BARTLETT, C. R.; CRYAN, J. R.; DIETRICH, C. H.; RAKITOV, R. A. **Suborder Auchenorrhyncha**: (cicadas, leafhoppers, planthoppers, spittlebugs, and treehoppers). 2008. Disponível em: <<http://www.lib.ncsu.edu/specialcollections/digital/metcalfe/auchenorrhyncha.html>>. Acesso em: 2 mar. 2015
- DESCOBERTOS mais seis vetores de CVC. **Revista do Fundecitrus**, v. 14, n. 94, p. 7-8, 1999.
- ECKSTEIN, B. **Enfezamento do brócolis**: identificação molecular de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos, e análise epidemiológica da doença. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ECKSTEIN, B.; BARBOSA, J. C.; KREYCI, P. F.; ZANOL, K. M. R.; COELHO, L. B. N.; GONÇALVES, A. C. S. M. L.; BRUNELLI, K. R.; LOPES, J. R. S.; BEDENDO, I. P. Identification of potential leafhoppers vectors of phytoplasmas (16SrIII group) associated with broccoli stunt disease in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 43, p. 459-463, 2014.
- FALK, B. W.; TSAI, J. H. Serological detection and evidence for multiplication of maize mosaic virus in the planthopper, *Peregrinus maidis*. **Phytopathology**, v. 75, p. 852-855, 1985.
- FRIZZAS, M. R.; OMOTO, C.; SILVEIRA NETO, S.; MORAES, R. C. B. Avaliação da comunidade de insetos durante o ciclo da cultura do milho em diferentes agroecossistemas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 2, p. 9-24, maio/ago. 2003.
- GIMÉNEZ PECCI, M. P.; LAGUNA, I. G.; LENARDÓN, S. **Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina**. Buenos Aires: INTA, 2012. 200 p.
- GRAZIA, J.; CAVICHIOLI, R. R.; WOLFF, V. R. S.; FERNANDES, J. A. M.; TAKIYA, D. Hemiptera. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. (Ed.). **Insetos do Brasil**: diversidade e taxonomia. São Paulo: Holos, 2012. p. 347-405.
- GREBER, R. G. Digitaria striate virus - a rhabdovirus of grasses transmitted by *Sogatella kolophon* (Kirk.). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 30, p. 43-51, 1979.
- GREBER, R. S. Maize sterile stunt: a delphacid transmitted rhabdovirus disease affecting some maize genotypes in Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 33, p. 13-23, 1982.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the insects**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 755 p.
- HARPAZ, I. **Maize rough dwarf**: a planthopper virus disease affecting maize, rice, small grains and grasses. Jerusalem: Israel Universities Press, 1972. 251 p.
- IBGE. **Mão na roda**: posição e extensão. Disponível em: <<http://teen.ibge.gov.br/mao-na-roda/posicao-e-extensao.html>>. Acesso em: 18 abr. 2015.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTVdB. **The Universal Virus Database**: version 4. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB>>. Acesso em: 17 mar. 2011.
- JUSTINIANO, W.; FERNANDES, M. G.; VIANA, C. L. T. P. Diversity, composition and population dynamics of arthropods in the genetically modified soybeans Roundup Ready® RR1 (GT 40-3-2) and Intacta RR2 PRO®(MON87701 x MON89788). **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 2, p. 33-44, 2014.
- KERSTING, U.; ŞENÇONCA, Q. Detection of insect vectors of the citrus stubborn disease pathogen, *Spiroplasma citri* Saglio et al., in the citrus growing area of South Turkey. **Journal of Applied Entomology**, v. 113, n. 1/5, p. 356-364, 1992.
- KING, A. B. S.; SAUNDERS, J. L. **The invertebrate pests of annual food crops in Central America**. London: TDRI, 1984. 166 p.
- KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. The ultrastructure of the corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic) virus-infected corn leaf tissues and viruliferous vector. **Fitopatologia Brasileira**, v. 7, p. 247-259, 1982.

- KITAJIMA, E. W.; VAN DER PAHLEN, A. Ocorrência do vírus da faixa clorótica das nervuras do milho no Distrito Federal e em Manaus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 2, p. 83-84, 1977.
- KITAJIMA, E. W.; YANO, T.; COSTA, A. S. Purification and intracellular localization of isometric viruslike particles associated with Brazilian corn streak virus infection. **Ciência e Cultura**, v. 28, p. 427-430, 1976.
- LASTRA, R. J. Maize mosaic and other maize virus and virus-like diseases in Venezuela. In: INTERNATIONAL MAIZE VIRUS DISEASE COLLOQUIUM AND WORKSHOP, 1976, Wooster, Ohio. **Proceedings...** Wooster: Ohio Agricultural Research, 1977. p. 30-39.
- LEÃO VEIGA, A. F. S. O parasitismo de ovos de cigarrinha do milho – *Peregrinus maidis* (Ashmed) por *Anagrus flaveolus* Waterhouse, 1913., (Hym:Mymaridae) em Pernambuco Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 4., 1977, Goiânia. **Programa...** Goiânia: Sociedade Entomológica do Brasil, 1977.
- LENARDÓN, S. L.; MARCH, G. J.; NOME, S. F.; ORNAGHI, J. A. Recent outbreak of “Mal de Río Cuarto Virus” on corn in Argentina. **Plant Disease**, v. 82, p. 448, 1998.
- LIU, Y.; ROTHENWÖHRER, C.; SCHERBER, C.; BATÁRY, P.; ELEK, Z.; STECKEL, J.; ERASMI, S.; TSCHARNTKE, T.; WESTPHAL, C. Functional beetle diversity in managed grasslands: effects of region, landscape context and land use intensity. **Landscape Ecology**, v. 29, n. 3, p. 529-540, 2014.
- LOPES, J. R. S.; NAULT, L. R.; GINGERY, R. E. Leafhopper transmission and host plant range of Maize chlorotic dwarf waikavirus strains. **Phytopathology**, v. 84, p. 876-882, 1994.
- LOPES, J. R. S.; OLIVEIRA, C. M. Vetores de vírus e mollicutes em milho. In: OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, C. M. de (Ed.). **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores, mancha por Phaeosphaeria**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. p. 35-60.
- LUFT ALBARRACIN, E. L.; PARADELL, S.; VIRLA, E. G. Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) associated with maize crops in northwestern Argentina, influence of the sowing date and phenology of their abundance and diversity. **Maydica**, v. 53, p. 289-296, 2008.
- MARÍN, R. Biología y comportamiento de *Dalbulus maidis* (Homoptera-Cicadellidae). **Revista Peruana de Entomología**, v. 30, p. 113-117, 1987.
- MARTINS, G. M.; TOSCANO, L. C.; TOMQUELSKI, G. V.; MARUYAMA, W. I. Eficiência de inseticidas no controle de *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) na cultura do milho. **Caatinga**, v. 21, n. 4, p. 196-200, 2008.
- 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**, v. 24, p. 136-142, 1999.
- MATTIO, M. F.; VELAZQUEZ, P. D.; TRUOL, G. A.; CASSOL, A.; ALEMANDRI, V.; SAGADÍN, M. B. Toya propinqua **Fieber como vector natural de Mal de Río Cuarto virus (MRCV)**. Córdoba: INTA-IFFIVE, 2005. (Hoja Informativa, 4).
- MENDES, L. O. T. **Observações sobre alguns insetos coletados sobre algodoeiro durante os anos de 1936 e 1937**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 1938. 15 p. (Boletim Técnico do Instituto Agrônomo, v. 45).
- MENESES, A. R. **Dinâmica populacional de Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) em cultivos de milho em Teresina-PI**. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- MIRANDA, J.; MUÑOZ, M.; WU, R.; ESPINOZA, A. M. Phylogenetic placement of a novel tenuivirus from the grass *Urochloa plantaginea*. **Virus Genes**, v. 22, p. 329-333, 2001.
- MOLINA, R. D. O.; GONÇALVES, A. M. O.; ZANUTTO, C. A.; NUNES, W. M. D. C. Populational fluctuation of vectors of *Xylella fastidiosa*, wells in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] varieties of northwest Paraná State, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 549-554, 2010.
- NAULT, L. R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica**, v. 35, p. 165-175, 1990.
- NAULT, L. R. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 503-529, 1989.
- 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.
- NIELSON, M. W. Leafhopper systematic. In: NAULT, L. R.; RODRIGUEZ, V. G. **The Leafhoppers and Plantahoppers**. New York: John Wiley, 1985. p. 11-40.
- O'BRIEN, L. B.; WILSON, S. W. Plantahoppers systematics and external morphology. In: NAULT, L. R.; RODRIGUEZ, V. G. **The Leafhoppers and Plantahoppers**. New York: John Wiley, 1985. p. 61-102.
- OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S. Cigarrinha-do-milho: aspectos taxonômicos e ecológicos, sobrevivência na entressafra. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. de (Ed.). **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por Phaeosphaeria**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 61-88.
- OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; NAULT, L. R. Genetic diversity in populations of *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) from distant localities in Brazil assessed by RAPD-PCR markers. **Environmental Entomology**, v. 36, n. 1, p. 204-212, 2007.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; DIAS, C. T. S.; NAULT, L. R. Influence of latitude and elevation on polymorphism among populations of the corn-leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. **Environmental Entomology**, v. 33, p. 1192-1199, 2004.

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

OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E.; SOUZA, I. R. P.; ALVES, E.; DOLEZAL, W.; PARADELL, S.; REMEZ-LENICOV, A. M. M.; FRIZZAS, M. R. Abundance and species richness of leafhoppers and planthoppers (Hemiptera: Cicadellidae and Delphacidae) in Brazilian maize crops. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 4, p. 1470-1481, 2013.

OLIVEIRA, E.; CARVALHO, R. V.; DUARTE, A. P.; ANDRADE, R. A.; RESENDE, R. O.; OLIVEIRA, C. M.; RECCO, P. C. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho Sorgo**, v. 1, p. 38-46, 2002b.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, A. C. Incidência de enfezamento e de *Maize Rayado Fino Virus* em milho em diferentes épocas de plantio e relação entre a expressão de sintomas foliares dos enfezamentos e produção. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 3, p. 221-224, 2003.

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O.; GIMÉNEZ PECCI, M. L. P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 19-25, 2003a.

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O.; GIMÉNEZ PECCI, M. L. P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Ocorrência e perdas causadas por mollicutes e vírus na cultura do milho safrinha no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 19-25, 2003b.

OLIVEIRA, E.; TERNES, S.; VILAMIU, R.; LANDAU, E. C.; OLIVEIRA, C. M. Abundance of the insect vector of two different Mollicutes plant pathogens in the vegetative maize cycle. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, n. 1, p. 117-118, 2015.

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

OMAN, P. W. Distribution of *Baudulus maidis* (DeLong & Wolcott). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 50, n. 2, p. 34, 1948.

ORNAGHI, J. A.; MARCH, G. J.; BOITO, G. T.; MARINELLI, A.; BEVIACQUA, J. E.; GIUGGIA, J.; LENARDON, S. L. Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli* vector of "Mal de Rio Cuarto" virus. **Maydica**, v. 44, p. 219-223, 1999.

PARADELL, S. L. Especies argentinas de Homópteros Cicadélidos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.). **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 71, p. 213-234, 1995.

PARADELL, S. L.; VIRLA, E. G.; TOLEDO, A. Leafhoppers species richness and abundance on corn crops in Argentina (Insecta-Hemiptera-Cicadellidae). **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, v. 27, p. 465-474, 2001.

REDINBAUGH, M. G.; SEIFERS, D. L.; MEULIA, T.; ABT, J. J.; ANDERSON, R. J.; STYER, W. E.; ACKERMAN, J.; SALOMON, R.; HOUGHTON, W.; CREAMER, R.; GORDON, D. T.; HOGENHOUT, S. A. Maize fine streak virus, a new leafhopper-transmitted rhabdovirus. **Phytopathology**, v. 92, p. 1167-1174, 2002.

REMES LENICOV, A. M. M.; TESÓN, A.; DAGOBERTO, E.; HUGUET, N. Hallazgo de uno de los vectores del "Mal de Río Cuarto" del maíz. **Gaceta Agronómica**, v. 5, p. 251-258, 1985.

REMES LENICOV, A. M. M.; VIRLA, E. G. Delfácidos asociados al cultivo de maíz en la República Argentina (Insecta-Homoptera-Delphacidae). **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 104, p. 1-15, 1999.

REMES LENICOV, A. M. M.; ZERBINO, S.; DEMARÍA, M. Especies de delfácidos (Homoptera, Delphacidae) presentes en el cultivo de maíz, en Uruguay. **Agrociencia**, v. 4, p. 93-95, 2000.

SALGADO, C. R. **Detección del fitoplasma causante de la marchitez amarilla de la remolacha (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera*), en cicadélidos (Homoptera: Cicadellidae) por PCR**. 23 f. Dissertação (Mestrado) - Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán.

SCHERBER, C.; VOCKENHUBER, E. A.; STARK, A.; MEYER, H.; TSCHARNTKE, T. Effects of tree and herb biodiversity on Diptera, a hyperdiverse insect order. **Oecologia**, v. 174, n. 4, p. 1387-1400, 2014.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn diseases**. 2nd ed. Saint Paul: APS Press, 1992. 105 p.

SILVA, A. G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. 622 p. Parte 2, tomo 1.

SILVA, A. H.; TOSCANO, L. C.; MARUYAMA, W. I.; PEREIRA, M. F. A.; CARDOSO, S. D. M. Controle de *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) DeLong & Wolcott (1923) por *Beauveria bassiana* na cultura do milho). **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, v. 35, n. 4, p. 657-664, 2009.

SILVA, R. F. D. **Ação e doses dos inseticidas lufenuron e lambdacialotrina no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: noctuidae)**. 2008. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- SINGH, B. U.; SEETHARAMA, N. Host plant interactions of the corn planthopper, *Peregrinus maidis* Ashm. (Homoptera: Delphacidae) in maize and sorghum agroecosystems. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 2, p. 163-196, 2008.
- THOTTAPPILLY, G.; BOSQUE-PEREZ, N. A.; ROSSEL, H. W. Viruses and virus diseases of maize Tropical Africa. **Plant Pathology**, v. 42, p. 494-509, 1993.
- TRIPLEHORN, B. W.; NAULT, L. R. Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the Macrostelini. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, p. 3, p. 291-315, 1985.
- TRUOL, G. A.; USUGI, T.; HIRAO, J. D.; GIMÉNEZ PECCI, M. P.; LAGUNA, I. G. Transmisión experimental del virus del mal de Río Cuarto por *Delphacodes kuskeli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 39-41, 2001.
- USDA. United States Department of Agriculture. **Production, supply and distribution online**: field crops: tables 4. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: 12 ago. 2014.
- VELAZQUEZ, P. D.; CONCI, L. R.; TRUOL, G. A. *Toya propinqua* (Hemiptera: Delphacidae): especie vectora del virus del mal de Río Cuarto (MRCV) en transmisiones experimentales. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 542, 2001.
- VELAZQUEZ, P. D.; GUZMAN, F. A.; CONCI, L. R.; REMES LENICOV, A. M. M.; TRUOL, G. A. *Pyrophagus tigrinus* Remes Lenicov & Varela (Hemiptera: Delphacidae), a new vector of the *Mal de Rio Cuarto virus* (MRCV, Fijivirus) under experimental conditions. **Agriscientia**, v. 23, p. 9-14, 2006.
- VIRLA, E.; MIOTTI, I.; GIMÉNEZ PECCI, M. P.; CARPANE, P.; LAGUNA, G. *Peregrinus maidis* (Hem.: Delphacidae), new experimental vector of the "Mal de Río Cuarto" disease to corn. **Biocell**, v. 28, p. 54, 2004.
- WAQUIL, J. M. Amostragem e abundância de cigarrinhas e danos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) em plântulas de milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, p. 27-33, 1997.
- WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; CRUZ, I.; SANTOS, J. P. Aspectos da biologia da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 3, p. 413-420, 1999.
- ZAHNISER, J. N.; DIETRICH, C. H. A review of the tribes of Deltocephalinae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae). **European Journal of Taxonomy**, v. 45, p. 1-211, 2013.

Capítulo 6

Modelagem matemática da dispersão da cigarrinha *Dalbulus maidis* e considerações sobre o surgimento de surtos epidêmicos de enfezamentos causados por mollicutes

Sônia Ternes | Raphael Gustavo d'Almeida Vilamiu



Introdução

No contexto atual da pesquisa agrícola, doenças em plantas, ervas daninhas e fatores ambientais são as três maiores ameaças da produção, principalmente em países menos desenvolvidos, onde tais fatores são responsáveis por cerca de 31% a 42% das perdas (VAN DEN BOSCH et al., 2006). Considerando que 14,1% do cultivo são perdidos em razão somente das doenças, estima-se que o total de perdas na produção agrícola mundial por causa de patologias em plantas é de cerca de US\$ 220 bilhões (CONTRERAS-MEDINA et al., 2009).

A fim de obter práticas sustentáveis para o gerenciamento tático e estratégico das doenças e também diminuir os impactos ambientais, é necessário compreender os fatores determinantes das epidemias. A modelagem matemática e a análise estatística têm sido usadas para auxiliar a compreensão de tais fatores. Nesses estudos, modelos são desenvolvidos a partir da simplificação da realidade, a fim de sintetizar o processo epidêmico. As ferramentas matemáticas têm sido cada vez mais utilizadas, pois permitem descrever a dinâmica da epidemia e, conseqüentemente, criar cenários para análise prospectiva da ocorrência das doenças e seus impactos, e avaliar a eficiência de diferentes mecanismos de controle.

A construção de modelos matemáticos para analisar a dinâmica da disseminação de doenças exige estudos que envolvem questões biológicas e matemáticas.

O uso de técnicas de modelagem matemática na análise de doenças transmissíveis teve início na área de saúde pública. Em 1760, o matemático holandês Daniel Bernoulli (1700–1782) utilizou um modelo matemático para avaliar a eficácia de técnicas de vacinação no controle de uma epidemia de varíola. Porém, o desenvolvimento de modelos matemáticos aplicados a fenômenos

epidemiológicos mais amplos ficou limitado por causa da restrição por falta de conhecimentos científicos mais específicos sobre os agentes causadores das doenças.

A partir da descrição do papel das bactérias como agentes causais de doenças por Louis Pasteur (1822–1895) e Robert Koch (1843–1910) e da descoberta do vírus por Dimitri Ivanovski (1864–1920), foi possível analisar as causas de doenças infecciosas e aplicar à epidemiologia modelos matemáticos mais fiéis à realidade. Pode-se descrever a epidemiologia como a ciência que estuda quantitativamente as epidemias e seus fatores determinantes, permitindo avaliar a eficácia da realização de possíveis intervenções para conter a evolução e a dinâmica de doenças.

Em 1906, o epidemiologista inglês W. H. Hamer (1839–1918) considerou que o desenvolvimento de uma epidemia depende da taxa de contato entre indivíduos suscetíveis e infecciosos. Este postulado, hoje conhecido na Epidemiologia como “Lei de Ação das Massas”, tornou-se um conceito básico para as teorias determinísticas subsequentes (GERHARDT, 2004).

Um avanço fundamental foi obtido a partir dos estudos matemáticos realizados pelos cientistas escoceses W. O. Kermack (1898–1970) e A. G. McKendrick (1876–1943) em 1927, que estabeleceram a teoria do limiar, segundo a qual a introdução de indivíduos infecciosos em uma comunidade pode não resultar em um surto epidêmico, a menos que a densidade de indivíduos suscetíveis esteja acima de certo valor crítico (KERMACK; MCKENDRICK, 1927). Essa teoria em conjunto com a Lei de Ação das Massas de Hamer constitui a base da epidemiologia matemática moderna. Os modelos determinísticos derivados de tais trabalhos podem ser classificados em modelos compartimentais do tipo SI, SIR, SEIR,

entre outras formas de representação compartimental das populações, que fazem parte da dinâmica da doença. Por exemplo, nos modelos SEIR considera-se a população de indivíduos dividida em quatro estados: suscetíveis (S), expostos (E), infectados (I) e removíveis ou recuperados (R).

Em razão do grande avanço tecnológico e do conhecimento biológico adquirido, a epidemiologia matemática se desenvolveu rapidamente após a divulgação desses trabalhos iniciais, principalmente depois de 1950. Nas últimas décadas, os trabalhos de dois cientistas contemporâneos, o epidemiologista inglês R. M. Anderson e o físico australiano R. M. May, no campo de modelos determinísticos, colaboraram substancialmente para aperfeiçoar conceitos fundamentais, simplificar as teorias matemáticas e, conseqüentemente, facilitar a compreensão e a divulgação da modelagem matemática junto aos profissionais das áreas biológicas.

O uso de modelos matemáticos compartimentais facilita a concepção e a compreensão da modelagem de doenças em plantas, pois possibilita a representação natural dos estágios da doença e dos agentes biológicos envolvidos, estimulando o trabalho conjunto das equipes multidisciplinares, fundamentais à realização dos estudos.

Mais recentemente, outra abordagem de modelagem vem sendo utilizada na pesquisa agropecuária. Trata-se dos modelos baseados em indivíduos (MBI), que têm sido usados na análise de processos ecológicos (GIACOMINI, 2007), pois são adequados para a modelagem de populações heterogêneas, em contraposição aos modelos determinísticos clássicos. A ideia principal de um MBI é tratar o indivíduo como uma unidade básica, autônoma e discreta, que toma decisões que podem interferir no ambiente. A população é

o nome dado ao conjunto de entidades discretas (indivíduos) da qual é composta. A ênfase do MBI está na interação entre os indivíduos, cujas características evoluem estocasticamente no tempo.

Este capítulo apresenta dois modelos matemático-computacionais desenvolvidos para avaliação da dinâmica de dispersão de cigarrinhas *Dalbulus maidis* como vetores transmissores dos mollicutes, agentes causais das doenças do milho denominadas enfezamentos, seguindo a abordagem determinística clássica e a abordagem baseada no indivíduo.

O modelo epidemiológico determinístico tem por objetivo representar a dinâmica temporal do patossistema “mollicutes-cigarrinha--cultivar” em uma lavoura de milho específica. Ainda, mimetiza a dinâmica espacial de migração das cigarrinhas com base na variação da capacidade de suporte dessa lavoura (EDELSTEIN-KESHET, 2005), por meio do conceito de fluxo em redes onde cada nó da rede representa uma lavoura de milho.

O modelo baseado no indivíduo mimetiza a movimentação de insetos adultos entre diferentes lavouras de milho, orientada por processos migratórios relacionados à preferência por plantas de idade jovem (nos estádios iniciais de desenvolvimento). Dessa forma, é possível avaliar o efeito de semeaduras sucessivas na atração e movimentação dos insetos.

A partir dos resultados dos modelos são avaliadas possíveis condições para o surgimento de surtos epidêmicos de enfezamentos.

Contexto biológico

A produção brasileira anual de milho é superior a 70 milhões de toneladas, representando mais de 40% da produção total de grãos (CONAB, 2013). Em algumas regiões do País há duas safras anuais, a principal ocorrendo no verão e a segunda no outono, denominada *safrinha* (ou segunda safra).

Entre as principais doenças que podem afetar a produção de milho destacam-se os enfezamentos pálido e vermelho, causados, respectivamente, pelos agentes *Spiroplasma kunkelli* e *mayze bushy stunt* (MBS) fitoplasma, ambos patógenos pertencentes à classe Mollicutes.

No Brasil, os mollicutes são transmitidos pela cigarrinha *Dalbulus maidis*, de modo propagativo persistente (OLIVEIRA et al., 2002). Pesquisas mostram (OLIVEIRA et al., 2002) que *D. maidis* possui grande habilidade para voar longas distâncias quando detecta condições climáticas não favoráveis, ou seja, baixa temperatura ou alta precipitação pluviométrica (OLIVEIRA et al., 2012).

O objetivo dos modelos matemáticos propostos é analisar a dinâmica espaço-temporal do patossistema “mollicutes-cigarrinha-milho”, considerando uma macrorregião formada por várias áreas cultivadas com esse cereal. Para tal, os modelos utilizam parâmetros biológicos estimados a partir da literatura e de experimentos realizados na Embrapa Milho e Sorgo (OLIVEIRA et al., 2009, 2015; SABATO; LANDAU, 2010).

Modelo matemático compartimental determinístico

Proposição teórica

Para a análise da dinâmica temporal local (numa lavoura de milho específica) do patossistema “molicutes-cigarrinha-milho” foi desenvolvido um modelo matemático compartimental determinístico do tipo SEI (EDELSTEIN-KESHET, 2005), considerando o ciclo de infecção no hospedeiro (planta) e a infectividade do inseto-vetor (cigarrinha). Além disso, para avaliar o aspecto espacial de migração das cigarrinhas entre diferentes áreas cultivadas com milho, utilizou-se o conceito de fluxos em rede, onde cada área representa um nó na rede.

Para a população de plantas hospedeiras (milho), considerou-se a mesma subdividida nos compartimentos de plantas suscetíveis (S_h) e infectadas (I_h). No caso do inseto-vetor, como as cigarrinhas apresentam um período de latência da doença, esta população foi representada pelos compartimentos de insetos suscetíveis (S_v), expostos (E_v) e infectantes (I_v).

Para a representação da dinâmica da doença, utilizou-se o seguinte conjunto de parâmetros: t é o período de latência dos molicutes na cigarrinha; α_v e μ_v são as taxas de natalidade e mortalidade da cigarrinha, respectivamente; b é a taxa de visitação das cigarrinhas; p_h é a probabilidade de transmissão de um inseto-vetor para a planta e p_v é a probabilidade de aquisição dos molicutes pelo inseto-vetor (Tabela 1).

Table 1 . Parâmetros de modelo.

Parametro	Valor	Referencias
α : Taxa de visitação para o inseto-vetor (cigarrinha)	0.1-dias ⁻¹	Vandermeer and Power (1990)
b : Taxa de natalidade para o inseto-vetor (cigarrinha)	2-dias ⁻¹	Vandermeer and Power (1990)
p_h : Probabilidade de transmissão dos vetores às plantas	0,46	Vandermeer and Power (1990)
p_v : Probabilidade de aquisição dos moliculites pelos vetores	0,835	Vandermeer and Power (1990)
T : Período de latência na população de votores	20 dias	Oliveira and Oliveira (2004)

A partir desses parâmetros, pode-se definir as forças de infecção λ_h e λ_v (KERMACK; McKENDRICK, 1927) para as populações de hospedeiros e vetores, respectivamente:

$$\lambda_h = bp_h \frac{I_v}{N_h}, \quad \lambda_v = bp_v \frac{I_h}{N_h}$$

em que N_h e N_v são as populações totais de hospedeiros e vetores, respectivamente, ou seja, $N_h = S_h + I_h$, $N_v = S_v + E_v + I_v$.

Além disso, tem-se ϕ_s como sendo o fluxo de migração de vetores suscetíveis (pertencente ao compartimento S_v), o qual é positivo para imigração e negativo para emigração. Analogamente, tem-se os fluxos ϕ_E e ϕ_I para os compartimentos E_v e I_v , respectivamente.

Assim, pode-se representar o modelo determinístico pelo sistema de equações diferenciais ordinárias (EDO) dado por:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dS_h}{dt} = -\lambda_h S_h \\ \frac{dI_h}{dt} = \lambda_h S_h \\ \frac{dS_v}{dt} = \alpha_v N_v \frac{S_h}{N_h} - \lambda_v S_v - \mu_v S_v - \phi_S \\ \frac{dE_v}{dt} = \lambda_v S_v - \frac{1}{\tau} E_v - \mu_v E_v - \phi_E \\ \frac{dI_v}{dt} = \alpha_v N_v \frac{I_h}{N_h} + \frac{1}{\tau} E_v - \mu_v I_v - \phi_I \end{array} \right.$$

A partir do sistema de EDOs acima, a dinâmica da população total de cigarrinhas $N_v(t)$ é dada por:

$$\frac{dN_v}{dt} = [\alpha_v - \mu_v] N_v$$

Para que a equação acima seja equivalente à equação de Verhulst (EDELSTEIN-KESHET, 2005), que considera que o crescimento de uma população é limitado por sua capacidade de suporte, a taxa de mortalidade dos vetores deve seguir a relação:

$$\mu_v = \frac{\alpha_v}{K} N_v$$

em que $K(t)$ é a máxima população dos vetores que uma dada área cultivada com milho consegue manter, isto é, a capacidade de suporte da lavoura de milho, com dependência temporal em função das condições climáticas locais e da idade das plantas hospedeiras.

O modelo proposto tem por objetivo considerar que o processo migratório esteja ligado à capacidade de suporte $K(t)$ de cada uma

das áreas cultivadas com milho, de forma a reforçar a dinâmica logística. Para tal, utiliza-se a diferença entre a população total de vetores $N_v(t)$ e a capacidade de suporte $K(t)$. Esta diferença é chamada de potencial migratório $P(t)$, expressa por $P(t) = N_v(t) - K(t)$.

Embora o mecanismo detalhado do processo migratório não seja conhecido, este é emulado por um comportamento observado (OLIVEIRA; LOPES, 2004): a cigarrinha tende a emigrar de uma área cuja população é maior que sua capacidade de suporte (alto potencial emigratório) para uma área com um potencial emigratório mais baixo, ou seja, uma área cuja população de cigarrinhas esteja abaixo de sua capacidade de suporte naquele momento.

A escolha da área para a qual a cigarrinha migra vai depender do potencial emigratório das áreas vizinhas. Especificamente, o modelo proposto considera que a cigarrinha migrará para a área vizinha com o menor potencial emigratório (naquele instante de tempo).

Como dito anteriormente, o valor do fluxo é dado de forma a também satisfazer a equação de Verhulst. Assim, tem-se que o fluxo total é dado por

$$\phi_S + \phi_E + \phi_I = rN_v \left(1 - \frac{N_v}{K} \right)^-$$

em que

$$f^-(x) = \max(-f(x), 0)$$

ou seja, os fluxos só ocorrerão quando seu sinal for negativo (processo de emigração).

Na equação do fluxo total, o parâmetro r representa uma taxa de decaimento do fluxo em função da distância entre as duas áreas dentre as quais existe um fluxo migratório. Além disso, é razoável supor que r seja proporcional à diferença entre os potenciais emigratórios das duas áreas. Assim, pode-se definir sua expressão como:

$$r(d) = \frac{\beta_3 \Delta P}{1 + \exp^{\frac{d}{\beta_1} - \beta_2}}$$

O denominador na expressão acima é justamente o decaimento em função da distância e está representado na Figura 1, onde se tomou $\beta_1, \beta_2 = 20$ de forma que $r(20) = 0.5$, ou seja, quando as duas áreas estão distantes a 20 km uma da outra, o fluxo cairá pela metade. Além disso, tomou-se $\beta_3 = 0,02$.

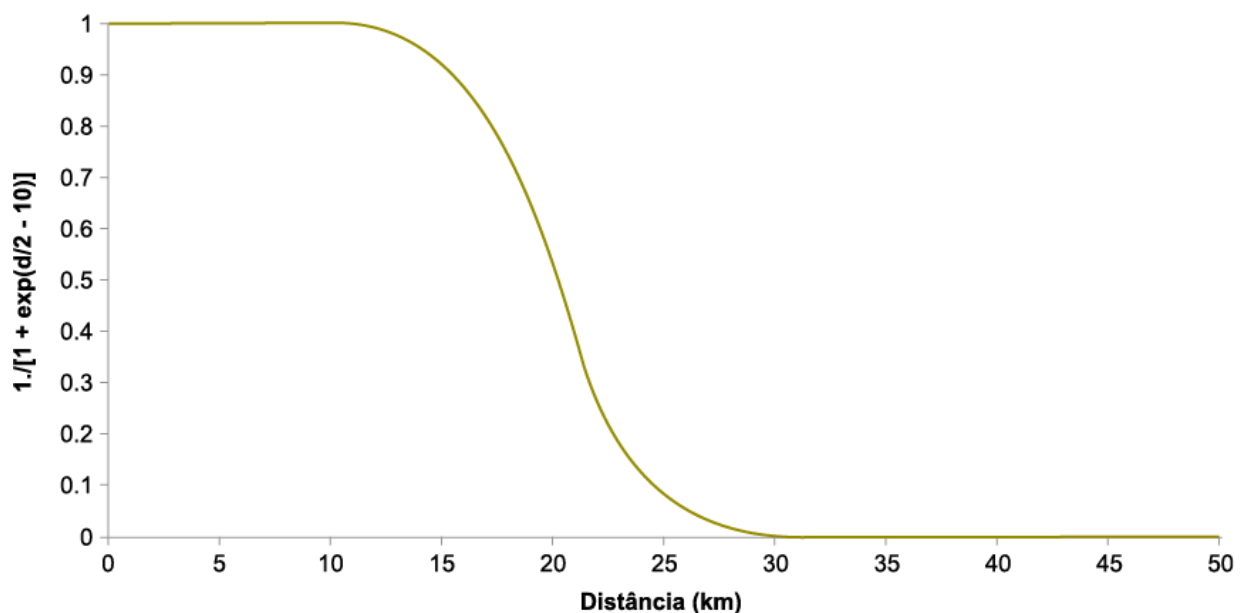


Figura 1. Equação logística da taxa de decaimento do fluxo de insetos em função da distância entre áreas de milho.

Também é razoável supor que o fluxo em cada um dos compartimentos do vetor seja proporcional à proporção de vetores naquele compartimento. Assim pode-se definir os fluxos por:

$$\phi_S(t; d; \Delta P) = \frac{0,02\Delta P}{1 + \exp\left(\frac{d}{10} - 5\right)} \left[1 - \frac{N_v}{K}\right]^{-} S_v$$

$$\phi_E(t; d; \Delta P) = \frac{0,02\Delta P}{1 + \exp\left(\frac{d}{10} - 5\right)} \left[1 - \frac{N_v}{K}\right]^{-} E_v$$

$$\phi_I(t; d; \Delta P) = \frac{0,02\Delta P}{1 + \exp\left(\frac{d}{10} - 5\right)} \left[1 - \frac{N_v}{K}\right]^{-} I_v$$

Resultados

Para verificar a influência da migração na dinâmica dos vetores, foram realizadas duas simulações, onde o sistema de EDO que descreve o modelo determinístico foi resolvido computacionalmente por meio do método denominado “Runge-Kutta de 4ª Ordem”, com o uso do software Matlab (MATHWORKS, 2009). A primeira, sem fluxo entre duas áreas próximas e a segunda, onde o fluxo é levado em consideração.

A Figura 2 apresenta a dinâmica para o primeiro caso, onde as duas áreas estão localizadas a 10 km de distância entre si. A dinâmica de cada compartimento na primeira área está representada na Figura 2A e a comparação entre a dinâmica da população total de vetores N_v e a capacidade de suporte K está representada na Figura 2B. As dinâmicas dos insetos na segunda área estão analogamente representadas nas Figuras 2C e D.

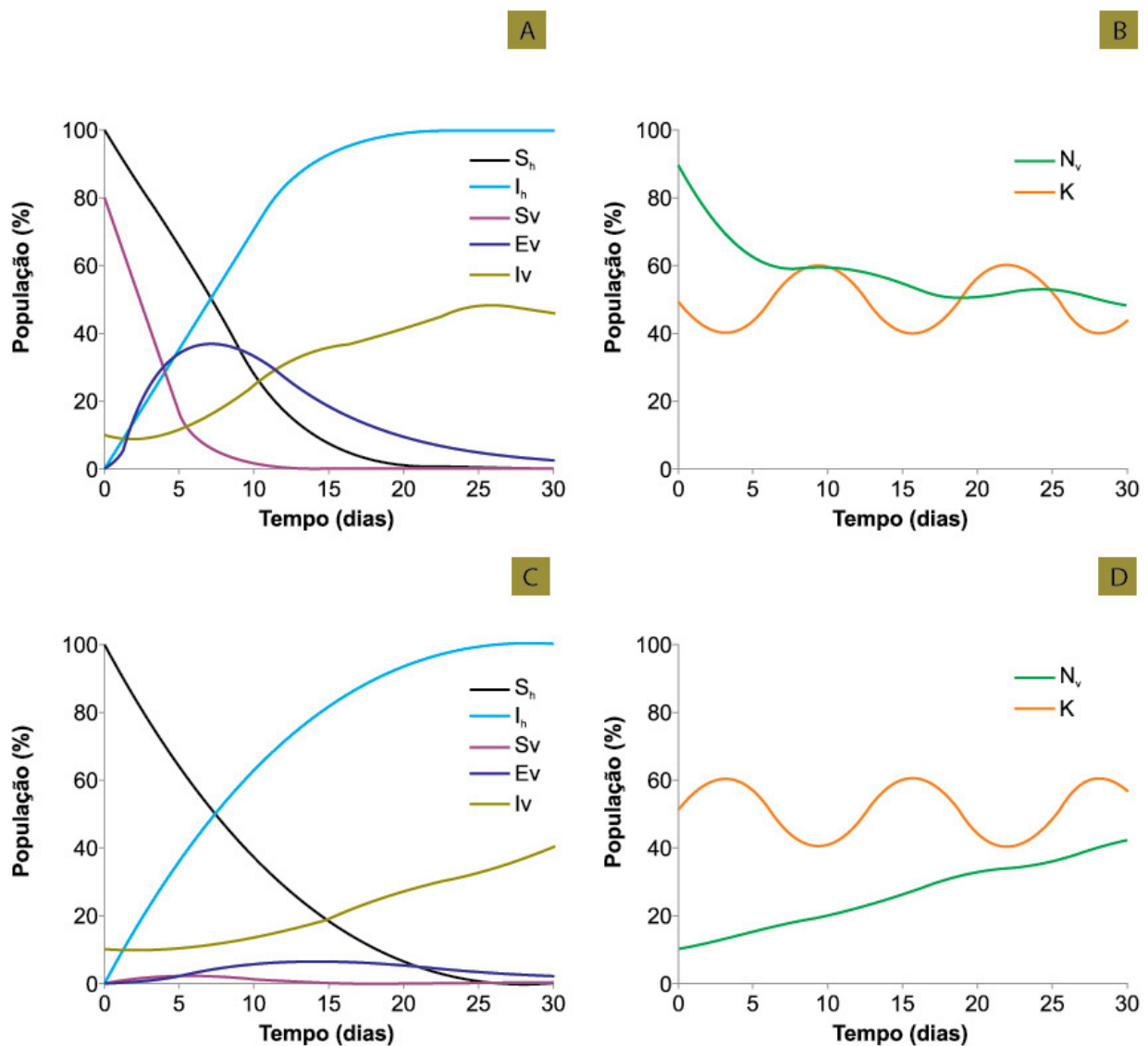


Figura 2. Dinâmica das cigarrinhas considerando duas áreas de milho localizadas a 10 km de distância entre si, sem fluxo entre as áreas, onde: S_h : proporção de milhos suscetíveis;

I_h : proporção de milhos infectados; S_v : proporção de insetos-vetores suscetíveis; E_v : proporção de insetos-vetores no estado de latência; I_v : proporção de insetos-vetores infectivos; N_v : população total de insetos-vetores; K : capacidade de suporte.

Observa-se que a população total de vetores N_v tende a se aproximar da capacidade de suporte, em razão da dinâmica de Verhulst definida no modelo.

Na simulação representada na Figura 3, o fluxo entre as áreas é levado em consideração.

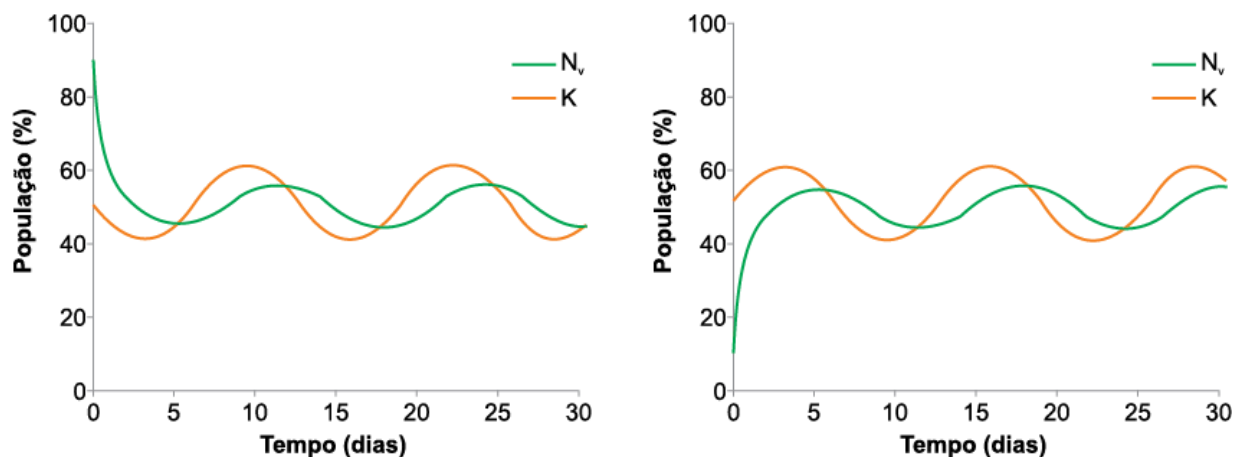


Figura 3. População de insetos vetores em um cenário, considerando duas áreas de milho localizadas a 10 km de distância entre si, levando em conta o fluxo de vetores entre as áreas, onde N_v : população total de insetos-vetores; K : capacidade de suporte.

Neste caso, observa-se uma mudança dramática na dinâmica da população total de cigarrinhas, as quais ficam agora muito mais próximas de suas respectivas capacidades de suporte, uma vez que há um intenso fluxo de cigarrinhas entre as duas áreas.

Modelo baseado no indivíduo

Proposição teórica

A modelagem baseada no indivíduo (MBI) tem sido usada na análise quantitativa de processos ecológicos, pois é adequada para modelar populações heterogêneas e facilita o estudo da dinâmica espacial, em contraposição aos modelos determinísticos (GIACOMINI, 2007).

A ideia principal de um MBI é tratar o indivíduo como uma unidade básica, autônoma, e discreta, que toma decisões que podem interferir no ambiente. A população é o nome dado ao conjunto de entidades discretas (indivíduos) da qual é composta. A ênfase do MBI está na interação entre os indivíduos, cujas características evoluem estocasticamente no tempo.

Para avaliação do potencial de propagação de mollicutes em milho, desenvolveu-se um modelo computacional seguindo a abordagem MBI. Tal modelo visa representar a dispersão de cigarrinhas *D. maidis*, entre diferentes áreas cultivadas com milho, visando avaliar o potencial de migração das cigarrinhas entre as áreas em função da idade das plantas em cada área.

O modelo foi formulado utilizando premissas epidemiológicas correspondentes ao trabalho de Vilamiu et al. (2013), e considerando a metodologia apresentada em Nepomuceno (2005) e Alvarenga (2008).

A Tabela 2 apresenta as duas populações consideradas no modelo e correspondentes características e categorias.

Tabela 2. Populações e características dos indivíduos considerados no MBI.

População	Característica	Categoria
H: planta hospedeira	H ₁ : localização geográfica	Localização na área cultivada com milho
	H ₂ : idade corrente	Número de dias desde a semeadura
	H ₃ : idade de remoção	Idade (dias) em que será colhido
V: inseto-vetor	V ₁ : localização	Localização da planta sobre a qual está o inseto-vetor
	V ₂ : idade corrente	Número de dias desde o nascimento
	V ₃ : idade máxima	Idade (dias) em que vai morrer

A Tabela 3 apresenta os processos considerados na simulação das dinâmicas às quais cada população é submetida, e que evoluem estocasticamente no tempo.

Tabela 3. Processos executados pelas populações.

População	Processo	Descrição
H	Semeadura	Se a idade corrente da planta passa de negativa a zero, uma planta é criada na área de semeadura
	Envelhecimento	A cada passo de simulação, a idade da planta é acrescida de 1 dia
	Colheita	Quando a planta atinge a idade de colheita (parâmetro de entrada), todas as plantas daquela área são removidas e os insetos ainda remanescentes emigram para nova área
V	Reprodução	Na idade adequada, os insetos-vetores se reproduzem com probabilidade seguindo distribuição Uniforme, dando origem a certo número de ninfas de acordo com a taxa média de reprodução por inseto
	Chegada	Entre 20 e 40 dias após a semeadura, novos insetos vetores podem chegar à área de plantio (atração), seguindo distribuição Normal. Para semeadura entre janeiro e fevereiro, considera-se uma chegada uniforme entre 10 e 30 insetos por planta; para semeadura entre abril e novembro, considera-se chegada uniforme entre 1 e 10 insetos por planta
	Migração	A partir de 60 dias da semeadura, insetos podem emigrar dentro do raio de busca onde se localizam plantas mais novas. A probabilidade de migração segue curva logística, crescente com a idade da planta
	Envelhecimento	A cada passo de simulação, a idade do inseto é acrescida de 1 dia
	Morte	Quando atinge idade limite, o inseto é removido do sistema

Os processos relacionados ao inseto-vetor são diretamente dependentes da idade da lavoura de milho onde ele se localiza, e foram definidos com base nos resultados obtidos em experimentos realizados na Embrapa Milho e Sorgo entre 2012 e 2013, quando

foram registradas as quantidades de insetos adultos capturados a cada 20 dias desde o momento da semeadura, em três diferentes áreas, em quatro épocas de semeadura (OLIVEIRA et al., 2015).

Simulação

O início das simulações computacionais corresponde ao tempo $t = 0$. O estado inicial das plantas pode ser iniciado com idade negativa ($H_2 < 0$) e a cada tempo a idade corrente é acrescida de uma unidade. Quando $H_2 = 0$ a semeadura é realizada, isto é, plantas são criadas na simulação e os processos relacionados à planta hospedeira passam a ser testados.

Os insetos são criados nas simulações com idade corrente igual a zero ($V_2 = 0$), mas nenhum processo ocorre até que o inseto atinja idade corrente superior ao período médio na fase de ninfa (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros biológicos usados nas simulações.

Parâmetro	Valor	Referência
Período médio de incubação do molicute no inseto	18 dias	Alvizatos e Markham (1986)
Longevidade média do inseto	63 dias	Tsai (1988), Waquil et al. (1999)
Período médio na fase de ninfa	24 dias	Tsai (1988), Waquil et al. (1999)
Número médio de oviposições (por fêmea, por geração)	2,5	Madden et al. (1984)
Número médio de ovos por postura por dia	40	Madden et al. (1984)
Viabilidade média de ovos	10%	Adotado ⁽¹⁾
Proporção de fêmeas na população de insetos	50%	Estimado ⁽²⁾
Raio de procura do inseto	30 km	Adotado ⁽³⁾

⁽¹⁾ Valor adotado com base na sensibilidade dos ovos à temperatura ambiente, à diferença entre as espécies de *Dalbulus* e às características do local de oviposição.

⁽²⁾ Proporção estimada supondo relação 1:1 entre fêmeas e machos provenientes dos ovos eclodidos.

⁽³⁾ Valor adotado de acordo com observação experimental onde cigarrinhas migraram numa região distando 30 km entre áreas produtivas mais próximas. (Oiveira e Oliveira, 2004).

Os valores numéricos das características das populações foram inicializados de acordo com os parâmetros de entrada das simulações (Tabela 4), sendo que H_2 , V_2 e V_3 recebem valores iniciais aleatórios, respeitando seus limites mínimos e máximos.

Os processos descritos na Tabela 3 foram implementados no software Matlab (MATHWORKS, 2009). A Tabela 4 mostra os valores dos parâmetros usados nas simulações computacionais, ilustradas no pseudocódigo apresentado na Figura 4.

-
1. Lê parâmetros de entrada

 2. Inicializa características das plantas em cada área de plantio

 3. Início do looping do passo de simulação
 - 3.1 Executa processo de chegada de insetos

 - 3.2 Executa processo de envelhecimento de plantas

 - 3.3 Executa processo de migração de insetos

 - 3.4 Executa processo de reprodução de insetos

 - 3.5 Executa processo de envelhecimento de insetos

 - 3.6 Executa processo de morte de insetos

 - 3.7 Executa processo de colheita

 - 3.8 Incrementa tempo de simulação

 4. Fim do looping de simulação

 5. Gera gráficos
-

Figura 4. Pseudocódigo do modelo computacional.

Os valores apresentados na Tabela 4 foram retirados da literatura científica específica, conforme indicados na tabela. Considerando que o objetivo do modelo computacional é verificar a adequação da abordagem MBI para representar a movimentação dos insetos entre diferentes áreas cultivadas com milho, assume-se que para esse exercício de simulação, o processo de parametrização está adequado. Entretanto, para que o modelo possa ser incorporado a simuladores robustos para uso prático, alguns experimentos biológicos fazem-se necessários, visando obter valores mais precisos para os parâmetros do modelo.

Para as simulações, implementou-se um reticulado de dimensão 10 x 10, considerando-se que cada célula representa 9 plantas, sendo o espaço total de 100 células ocupado por três áreas distintas de

semeadura do milho. Foi considerado um ano hipotético de
semeadura, com a simulação iniciada em 1º de janeiro, supondo-se
temperaturas favoráveis à disseminação da doença, resultando em
estudo de “pior caso”. As áreas de semeadura foram posicionadas
da seguinte forma (Figura 5):

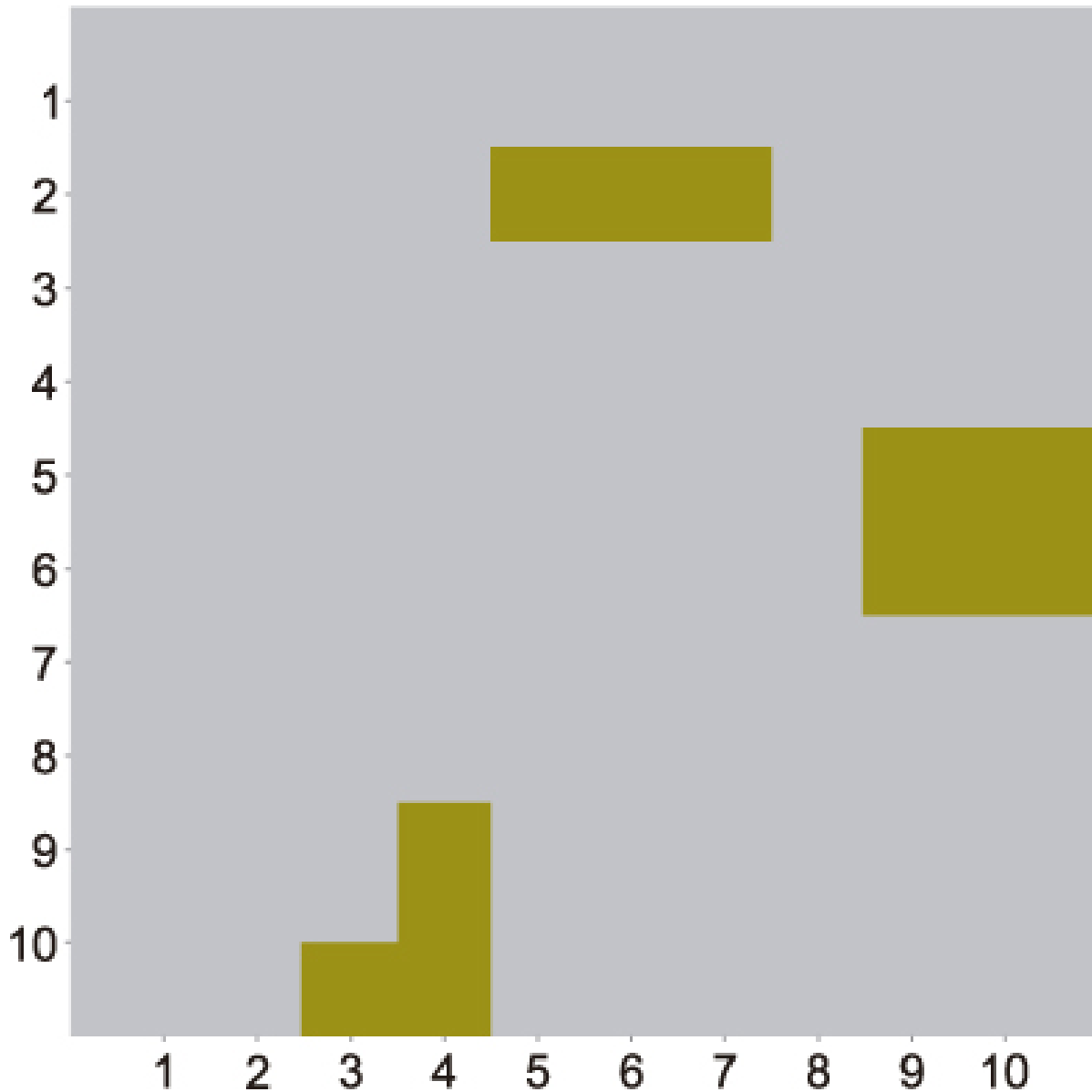


Figura 5. Posição das três áreas de semeadura consideradas no reticulado concebido para o modelo computacional.

- Área 1: células (9,4), (10,3) e (10,4); semeadura em 10 de janeiro e colheita em 140 dias;
- Área 2: células (2,5), (2,6) e (2,7); semeadura em 20 de janeiro e colheita em 120 dias;
- Área 3: células (6,9), (6,10), (7,9) e (7,10); semeadura tardia em 25 de fevereiro e colheita em 140 dias.

Resultados

Nesta seção é apresentado os resultados obtidos com uma simulação do modelo MBI, considerando os parâmetros da Tabela 4 para as três áreas descritas anteriormente.

Na Figura 6, tem-se cada processo populacional em cada uma das áreas plotados em função do tempo: natalidade, mortalidade, chegada, emigração e imigração.

Na Figura 6A, observa-se que a maior variação populacional no começo da simulação se deve ao processo de chegada, que trata de um processo imigratório de cigarrinhas presentes na região. Em seguida, os processos dominantes são a natalidade e mortalidade, que são locais. No final do período simulado, vemos que o processo de emigração (em razão da idade avançada das plantas) se destaca como sendo o mais intenso na área.

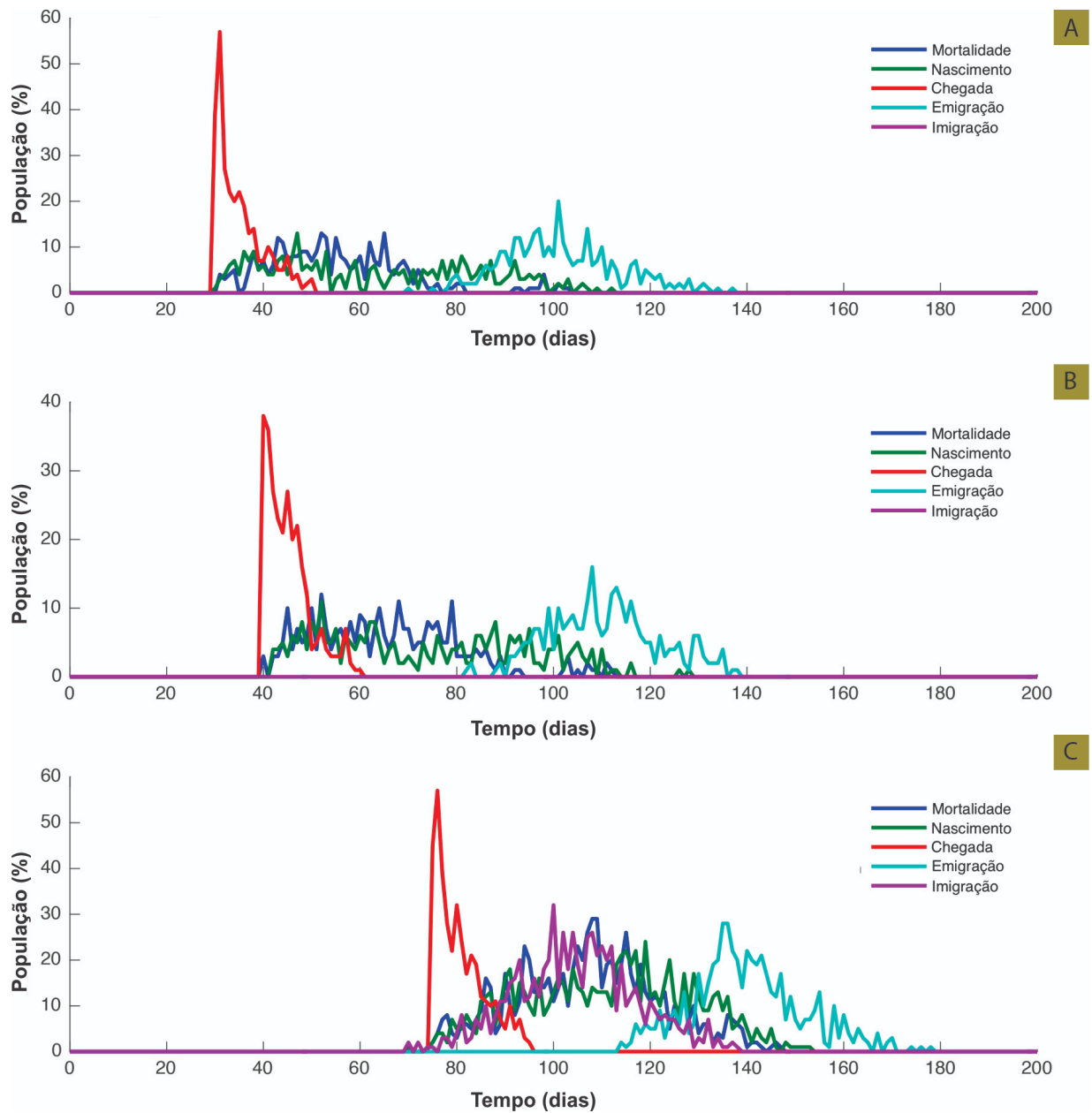


Figura 6. Flutuação da população de cigarrinhas (%) em cada área simulada: a) área 1; b) área 2; c) área 3.

Na Figura 6B, verifica-se um comportamento semelhante para área 2, em que a variação populacional pode ser dividida em três momentos distintos: chegada (imigração de insetos da região), variação local (natalidade e mortalidade) e emigração (por causa da idade avançada das plantas da área).

Na Figura 6C tem-se o resultado para a área 3. Embora os processos sejam semelhantes aos verificados para as áreas 1 e 2, existe uma diferença substancial: um acentuado processo de imigração no período de variação local. Essa grande quantidade de insetos imigrando para a área são exatamente os insetos que estão emigrando das áreas 1 e 2, cujas plantas foram obtidas de semeadura em data anterior e, por isso, não são mais atrativas às cigarrinhas.

A dinâmica resultante a partir de todos os processos está representada na Figura 7.

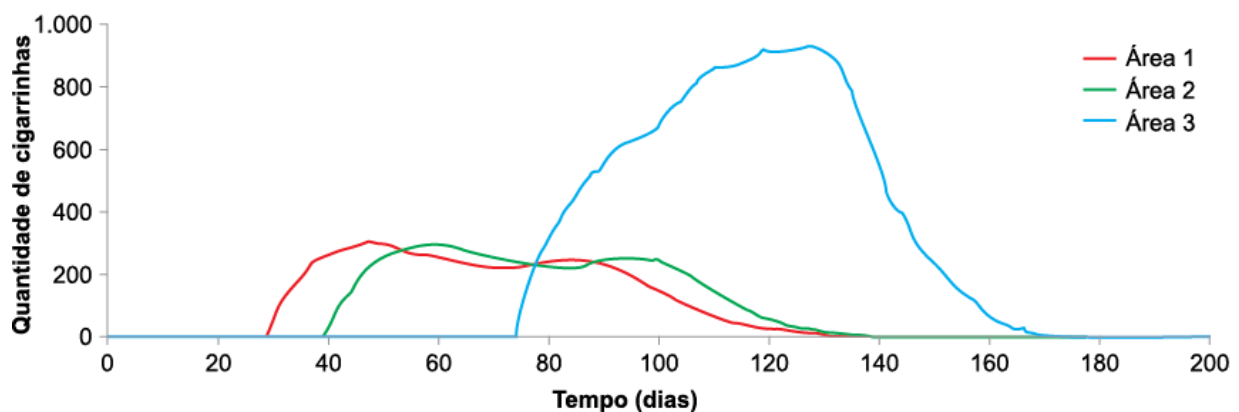


Figura 7. Quantidade de cigarrinhas resultante do modelo MBI.

Pode-se perceber que a infestação de cigarrinhas na área 3 é muito maior do que nas duas outras áreas por causa da imigração de cigarrinhas provenientes das outras duas áreas.

Este resultado é importante no sentido de alertar o produtor de milho que a semeadura tardia pode resultar numa grande incidência de enfezamentos na área, uma vez que cigarrinhas presentes em áreas próximas tenderão a imigrar para áreas mais jovens na região.

O MBI apresentado explora o processo de movimentação de insetos entre as áreas, sem considerar o estado epidemiológico das plantas hospedeiras e dos insetos. Para que isso possa ser incluído no MBI, faz-se necessária a obtenção de informações sobre aspectos relacionados à doença e sua inter-relação com fatores abióticos, como temperatura e umidade.

Considerações finais

O uso das modernas técnicas de análise e de modelagem matemática permite a prévia elaboração de cenários epidemiológicos, sendo aplicadas às análises espaço-temporais de epidemias, métodos de controle e de manejo de doenças em plantas, e deve considerar alguns itens de expressiva importância:

- Avaliação de métodos possíveis de controle, que vão desde os métodos físicos, como exclusão, até (bio)químicos, como erradicação e/ou resistência gênica ao fitopatógeno.
- Desenvolvimento de estratégias (ou táticas) de controle sobre o plantio;
- Formas de manejo integrado de doenças.
- Estudos sobre as eficiências de aplicação de compostos químicos.

Do ponto de vista macroscópico, os modelos compartimentais de EDOs avaliam os itens supra descritos sob o ponto de vista macroscópico, generalizando as características das populações envolvidas, o que resulta em cenário geral dos mecanismos pertinentes ao avanço da doença. Tal abordagem é indicada quando

se pretende estudar aspectos como a transmissão dos agentes causais da doença, bem como as dinâmicas de instalação e proliferação do fitopatógeno em uma população específica, estudar mecanismos que compõem as interações vetor-patógeno-hospedeiro e o ciclo de vida do patógeno (ou do vetor) sob determinadas condições climáticas, além do mutualismo biológico utilizado em controle de pragas, por exemplo.

Porém, características como o arranjo espacial das plantas doentes, modelos do padrão (ou gradiente) de ocupação e dispersão dos fitopatógenos, formas de contato (preferências do vetor por este ou aquele tipo de planta), heterogeneidade das concentrações dos fitopatógenos nas plantas e a existência de um ou mais agentes infecciosos na mesma planta, indicam a necessidade de uma abordagem mais microscópica, como a da modelagem baseada no indivíduo, considerando estes (e outros fatores) na propagação da doença em uma área específica.

As duas metodologias matemáticas apresentadas aqui são complementares, quando aplicadas na elaboração de cenários prováveis das doenças infecciosas, fornecendo informações que auxiliam nas tomadas de decisão e na adoção de estratégias de monitoramento de surtos e análise econômica de controle para inativação ou erradicação da doença infecciosa a um custo reduzido.

Dois modelos foram desenvolvidos para avaliar a dinâmica migratória de cigarrinhas e a incidência de enfezamentos em áreas de cultivo de milho.

O primeiro modelo matemático apresentado é determinístico e representado por um sistema de equações diferenciais ordinárias

(EDOs). A partir de seus resultados verifica-se que o fluxo migratório entre duas áreas próximas pode alterar drasticamente o nível populacional das cigarrinhas presentes. Tal fluxo previsto pelo modelo seria gerado por causa da diferença entre a capacidade de suporte de cigarrinhas de cada área em análise e sua população de insetos-vetores.

Este resultado indica que, para prever a população de cigarrinhas em uma determinada área, seria necessário conhecer as condições climáticas dentro do raio de alcance de voo da cigarrinha (estimado maior que 30 km), além do monitoramento constante das populações de cigarrinhas nessas áreas.

Para que tal monitoramento pudesse ser efetivamente realizado, poderiam ser utilizadas, por exemplo, tecnologias modernas de automatização de captura de insetos em armadilhas com feromônio e registro de imagem por câmeras digitais interligadas a computadores conectados à internet, como também o processamento digital das imagens para determinar o número de insetos capturados em determinado intervalo de tempo.

O segundo modelo apresentado utilizou a abordagem denominada modelagem baseada no indivíduo (MBI) para avaliar os processos migratórios entre áreas próximas, com datas de semeadura distintas.

Os resultados desse modelo indicam que áreas com semeadura tardia tendem a ter uma população muito maior que aquelas com semeadura na época regular. Desta forma, a incidência de enfezamento deve ser bem maior nesses casos, o que deve ser levado em consideração pelo produtor, além das variáveis econômicas e meteorológicas já estabelecidas.

Referências

- ALIVIZATOS, A. S.; MARKHAM, P. G. Acquisition and transmission of corn stunt spiroplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals of Applied Biology**, v. 108, p. 535-544, 1986.
- ALVARENGA, L. R. A. **Modelagem de epidemias através de modelos baseados no indivíduo**. 2008. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, safra 2012/13, oitavo levantamento, maio 2013**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_09_11_56_07_boletim_2_mai_o_2013.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2015.
- CONTRERAS-MEDINA, L. M.; TORRES-PACHECO, I.; GUEVARA-GONZALEZ, R. G.; ROMERO-TRONCOSO, R. J.; TEROL-VILLALOBOS, I. R.; OSORNIO-RIOS, R. A. Mathematical modeling tendencies in plant pathology. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 25, p. 7399-7408, 2009.
- EDELSTEIN-KESHET, L. **Mathematical models in biology**. New York: McGraw-Hill, 2005.
- GERHARDT, M. P. **Modelo de transmissão da dengue com competição larval uniforme**. 2004. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- GIACOMINI, H. C. Sete motivações teóricas para o uso da modelagem baseada no indivíduo em ecologia. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 3, p. 431-446, 2007.
- KERMACK, W. O.; MCKENDRICK, A. G. A contribution to the mathematical theory of epidemics. **Proceedings of the Royal Society a Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 115, n. 772, p. 700-772, 1927.
- MADDEN, L. V.; NAULT, L. R.; HEADY, S. E.; STYER, W. E. Effect of maize stunting mollicutes on survival and fecundity of *Dalbulus* leafhopper vectors. **Annals of Applied Biology**, v. 105, n. 3, p. 431-441, Dec. 1984.
- MATHWORKS. **Matlab: the language of technical computing: R2009a**. Natick, 2009.
- NEPOMUCENO, E. G. **Dinâmica, modelagem e controle de epidemias**. 2005. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OLIVEIRA, C. M. de; LOPES, J. R. S. Cigarrinha-do-milho: aspectos taxonômicos e ecológicos, sobrevivência na entressafra. In: OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, C. M. de (Ed.). **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores, mancha por Phaeosphaeria**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. p. 61-88.

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

OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, C. M. de (Ed.). **Doenças em milho**: mollicutes, vírus, vetores, mancha por *Phaeosphaeria*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 276 p.

OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, C. M. de; LANDAU, E. C. Maize bushy stunt phytoplasma in Brazil. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 2, n. 1, p. 1-8, June 2012.

OLIVEIRA, E. de; SANTOS, J. C.; MAGALHAES, P. C.; CRUZ, I. **Mudanças climáticas poderão favorecer doença causada por fitoplasma na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 4 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 126).

OLIVEIRA, E. de; TERNES, S.; VILAMIU, R.; LANDAU, E. C.; OLIVEIRA, C. M. de. Abundance of the insect vector of two different mollicutes plant pathogens in the vegetative maize cycle. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, S117-S118, 2015.

SABATO, E. de O.; LANDAU, E. C. **Influência da temperatura nos sintomas causados pelo enfezamento pálido do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 151).

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

VANDERMEER, J.; POWER, A. An epidemiological model of the corn stunt system in Central America. **Ecological Modelling**, v. 52, p. 235-248, 1990.

VAN DEN BOSCH, F.; AKUDIBILAH, G.; SEAL, S.; JEGER, M. Host resistance and the evolutionary response of plant viruses. **Journal of Applied Ecology**, v. 43, p. 506-516, 2006.

VILAMIU, R. G. D' A.; TERNES, S.; OLIVEIRA, E. A network based model for the spread of mollicutes by *Dalbulus maidis* on maize crop fields. In: EFITA-WCCA-CIGR CONFERENCE, 2013, Torino, Italy. **Sustainable agriculture through ICT innovation**. [S. l.: s. n], 2013. p. 1145-1152.

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

Capítulo 7

Controle químico da cigarrinha *Dalbulus maidis* e efeito na incidência dos enfezamentos do milho

Charles Martins de Oliveira | Elizabeth de Oliveira Sabato



Introdução

A cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), inseto-vetor dos mollicutes (espiroplasma e fitoplasma), agentes causais dos enfezamentos do milho, no Brasil, apresenta características bioecológicas como: elevado potencial biótico, capacidade de migrar a longas distâncias (OLIVEIRA, 2000; OLIVEIRA et al., 2013), alta eficiência e rápida transmissão desses fitopatógenos (LEGRAND; POWER, 1994), que dificultam a implantação de planos eficientes para o manejo desse vetor e redução da incidência dessas doenças.

Para insetos-vetores, não é possível a determinação do nível do dano econômico (NDE) e do nível de controle ou de ação (NC), uma vez que os danos por esses insetos são indiretos, e não são necessariamente proporcionais ao tamanho de sua população. Assim, em geral, é necessário usar medidas preventivas para evitar os insetos-vetores e escapar das doenças disseminadas por eles (PEDIGO, 1999).

Entre as ferramentas disponíveis para o manejo integrado de pragas (MIP), o tratamento com inseticidas tem sido um dos métodos mais amplamente utilizados no mundo (OLIVEIRA et al., 2014). O controle químico de *D. maidis* tem sido estudado desde a década de 1970 (BHIRUD; PITRE, 1972; PERFECTO, 1990; TSAI et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2007, 2008). Porém, há dúvidas se a utilização de inseticidas para a proteção das plantas de milho pode resultar na redução da incidência ou da severidade dos enfezamentos, principalmente na fase inicial de

desenvolvimento, quando ocorre a infecção com mollicutes (HRUSKA; PERALTA, 1997; MASSOLA JÚNIOR et al., 1999), ou mesmo em outras fases do desenvolvimento da cultura.

Neste capítulo encontram-se informações sobre o controle químico de *D. maidis* na cultura do milho e considerações sobre o efeito desse controle na redução da incidência de enfezamentos por mollicutes.

Controle químico de *Dalbulus maidis* no Brasil

Atualmente existem 15 produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), para o controle de *D. maidis* na cultura do milho, sendo 14 inseticidas (em sua maioria neonicotinoides) e um produto biológico à base de *Beauveria bassiana* (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de inseticidas (químicos e biológicos) registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) para o controle de *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) na cultura do milho no Brasil.

Produto	Ingrediente ativo (grupo químico)	Formulação	Classe
Bovebio	<i>Beauveria bassiana</i> (biológico)	WP – pó molhável	IV
Inside FS	Clotianidina (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	III
Poncho	Clotianidina (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	III
Gaucho FS	Imidacloprido (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	III
Imidacloprid Nortox	Imidacloprido (neonicotinoide)	SC – suspensão concentrada	II
Imidacloprid 600 FS	Imidacloprido (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	III
Much 600 FS	Imidacloprido (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	III
Picus	Imidacloprido (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	III
Saluzi 600 FS	Imidacloprido (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	III
Siber	Imidacloprido (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	III
Sombbrero	Imidacloprido (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	III
Cruiser Opti	Lambda-cialotrina (piretroide) + tiametoxam (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	I
ADAGE 700 WS	Tiametoxam (neonicotinoide)	DS – pó para tratamento a seco de sementes	III
Cruiser 350 FS	Tiametoxam (neonicotinoide)	FS – suspensão concentrada para tratamento de sementes	III
Cruiser 700 WS	Tiametoxam (neonicotinoide)	WS – pó dispersível para tratamento de sementes	III

Fonte: Agrofitec (2015).

Os estudos sobre o uso de inseticidas para o controle de *D. maidis*, conduzidos no Brasil, envolvem a utilização de produtos em tratamento de sementes, conjugados, ou não, com a pulverização da parte aérea das plantas, na fase inicial da cultura do milho (WAQUIL; CRUZ, 1994; ALBUQUERQUE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007, 2008; MARTINS et al., 2008). Entretanto, em poucos desses estudos foi avaliada a ação dos inseticidas na redução da incidência dos enfezamentos do milho.

Eficiência de inseticidas no controle do inseto-vetor

Na década de 1990, em estudos realizados em Minas Gerais com tratamento de sementes de milho para a safrinha, com inseticidas (fipronil, tiodicarbe, carbofurano, carbofurano +

micronutrientes) para reduzir a infestação de *D. maidis*, verificou-se que os produtos utilizados não proporcionaram diferenças significativas na redução da população desse inseto--vetor (WAQUIL; CRUZ, 1994).

No Paraná, na safra de verão 2003/2004, foram usados o inseticida tiametoxam, aplicado por tratamento de sementes, e os inseticidas tiametoxam + lambda-cialotrina, metamidofós e lufenuron, aplicados nas folhas, entre 8 e 12 dias após a emergência das plantas de milho (ALBUQUERQUE et al., 2006). Observou-se que a aplicação isolada de tiametoxam + lambda-cialotrina, em pulverização, mostrou eficiência de controle de *D. maidis* entre 86% e 93%, aos 15 dias após a emergência das plantas (DAE). A associação de tiametoxam em tratamento de sementes, com pulverizações de metamidofós ou tiametoxam + lambda-cialotrina, garantiu eficiência de controle das cigarrinhas entre 89% e 100%, até 18 DAE. O tratamento de sementes com tiametoxam e pulverizações com tiametoxam + lambda-cialotrina controlaram 100% das cigarrinhas aos 11 e 18 DAE. O inseticida metamidofós apresentou eficiência de controle de no máximo 71% e o lufenuron não apresentou eficiência de controle desse inseto-vetor (ALBUQUERQUE et al., 2006).

Em estudo conduzido no Mato Grosso do Sul, na safra 2004/2005, foram usados os inseticidas monocrotophós e cipermetrina, aplicados na dessecação, thiodicarb + imidacloprid, thiametoxan, clothianidim, imidacloprid e acetamiprid, em tratamento de sementes, e cipermetrina + thiametoxan e endossulfan + NaCl, aplicados por meio de pulverizações nas folhas, aos 10 dias após a emergência das plântulas, para controle de *D. maidis* (MARTINS et al., 2008). Nesse estudo, os produtos usados em tratamento de sementes foram os mais eficientes. Aos 14 DAE, o inseticida thiodicarb + imidacloprid mostrou eficiência de controle de 85%; aos 20 DAE, clothianidim alcançou eficiência de 75%; e aos 28 e 40 DAE, o inseticida imidacloprid mostrou 74% e 72% de eficiência no controle do vetor, respectivamente (MARTINS et al., 2008).

Em Minas Gerais, em condições de viveiro telado, foi testada a eficiência de inseticidas em tratamento de sementes sobre a mortalidade de adultos de *D. maidis*. Foram usados os inseticidas sistêmicos thiamethoxan, imidacloprid, thiodicarb, thiodicarb + Zn, carbofuran, carbofuran + Zn e carbosulfan (OLIVEIRA et al., 2008). As cigarrinhas foram expostas às plantas de milho tratadas, usando de gaiolas de confinamento, e a mortalidade foi avaliada em intervalos de sete dias entre dois e 58 DAE. Observou-se que, com exceção de carbofuran + Zn, todos os produtos causaram mortalidade entre 94% e 100% das cigarrinhas, aos dois DAE. De maneira geral, os inseticidas thiamethoxan e imidacloprid foram os mais eficientes e mostraram resultados semelhantes em todas as datas de avaliação. A mortalidade provocada por esses dois inseticidas foi superior a 90% até 16 DAE e igual ou superior a 70% até 30 DAE (OLIVEIRA et al., 2008).

Controle de *Dalbulus maidis* e reflexos na transmissão dos mollicutes

Embora se reconheça a importância de *D. maidis* como vetor de agentes causais de doenças em milho na América Latina, no Brasil, até o momento, apenas um estudo foi conduzido para se

avaliar a eficiência de inseticidas sobre as populações desse inseto e os reflexos sobre a incidência dos enfezamentos.

O estudo foi conduzido em viveiro telado e em campo, em Minas Gerais. Em viveiro telado, usou-se thiamethoxan e imidacloprid em tratamento de sementes e avaliou-se a eficiência desses inseticidas sobre a mortalidade de cigarrinhas sadias e de cigarrinhas infectantes com fitoplasma e espiroplasma, e também incidência de plantas com sintomas de enfezamentos, a altura das plantas e a produção de grãos. Grupos de plântulas de milho obtidas de sementes tratadas ou não tratadas com os inseticidas, entre dois e 30 DAE, semanalmente, foram, separadamente, submetidas a grupos de cigarrinhas sadias ou de cigarrinhas infectantes com mollicutes (espiroplasma e fitoplasma). A mortalidade dessas cigarrinhas foi avaliada 96 horas após o confinamento nas plântulas (OLIVEIRA et al., 2007). No campo, esses mesmos inseticidas foram usados em tratamento de sementes, combinados ou não com pulverizações, aos dez e vinte dias da emergência das plântulas. A incidência dos enfezamentos foi avaliada aos 100 DAE, em cada tratamento.

No experimento conduzido em viveiro telado, os produtos imidacloprid e thiamethoxan apresentaram alta eficiência de controle até 23 DAE ($\geq 70\%$) tanto para cigarrinhas sadias quanto para cigarrinhas infectantes com mollicutes. Esses dois inseticidas apresentaram eficiência de controle do vetor semelhante, em todos os estádios de desenvolvimento das plântulas submetidas à inoculação, exceto quando a inoculação foi feita aos 16 dias após a emergência, em que imidacloprid mostrou-se significativamente superior ao thiamethoxan (Tabela 2).

Tabela 2. Eficiência média dos inseticidas (% de mortalidade) utilizados em tratamento de sementes no controle de adultos da cigarrinha *Dalbulus maidis* (sadios, infectantes com fitoplasma, infectantes com espiroplasma), que foram confinados por 96 horas sobre plantas de milho-pipoca, em períodos sucessivos de tempo após a emergência, em viveiro telado protegido contra insetos.

Idade ⁽¹⁾	Imidacloprid				Thiamethoxan			
	Fitoplasma	Espiroplasma	Sadia	Média ⁽²⁾	Fitoplasma	Espiroplasma	Sadia	Média
2	100	100	96	99 aA	100	98	100	99 aA
9	100	100	100	100 aA	98	100	95	98 aA
16	97	100	93	97 aA	84	88	85	86 bB
23	81	79	78	79 aB	75	70	71	72 aC
30	52	51	60	54 aC	59	55	53	56 aD

⁽¹⁾Idade das plantas (dias após a emergência) no momento em que foram submetidas a cigarrinhas infectantes com mollicutes ou a cigarrinhas sadias.

⁽²⁾Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Com relação à transmissão dos mollicutes, observou-se que apenas imidacloprid causou a redução da incidência dos enfezamentos, principalmente quando as plântulas foram submetidas às cigarrinhas infectantes entre dois e nove DAE (Tabela 3). Reduções na transmissão e na expressão de sintomas também foram observadas nas plantas submetidas às cigarrinhas infectantes aos 30 DAE, principalmente para o fitoplasma (OLIVEIRA et al., 2007).

As plantas de milho tratadas com imidacloprid não apresentaram redução em altura para fitoplasma. Para o espiroplasma, a redução em altura aconteceu para nove e 16 DAE, demonstrando o efeito do inseticida na prevenção da infecção, e conseqüentemente, na expressão de sintomas das doenças, quando a inoculação foi feita em plântulas aos dois DAE (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem média de plantas que apresentaram sintomas foliares de enfezamento (100 dias após emergência), altura média (m) e produção média de grãos (g) de plantas de milho-pipoca submetidas ou não ao tratamento inseticida de sementes e a cigarrinhas sadias, infectantes com fitoplasma, infectantes com espiroplasma, em períodos sucessivos de tempo (após a emergência), em viveiro telado protegido contra insetos.

Idade(1)	Imidacloprid			Thiamethoxan			Semente não tratada		
	Fitoplasma	Espiroplasma	Sadia	Fitoplasma	Espiroplasma	Sadia	Fitoplasma	Espiroplasma	Sadia
Porcentagem de plantas com sintomas									
2	10 aAA ⁽²⁾	10 aAA	0 aAA	30 bBA	60 cAB	0 aAA	100 bBB	100 bAC	0 aAA
9	60 bBA	70 bBA	0 aAA	100 bCB	100 bBB	0 aAA	100 bBB	100 bAB	0 aAA
16	100 bCA	90 bCA	0 aAA	100 bCA	100 bBA	0 aAA	100 bBA	100 bAA	0 aAA
23	70 bBA	100 cCA	0 aAA	80 bCA	100 bBA	0 aAA	80 bBA	100 bAA	0 aAA
30	10 aAA	70 bBA	0 aAA	0 aAA	100 bBA	0 aAA	0 aAA	80 bAA	0 aAA
Altura de Plantas									
2	1,52 aBA	1,54 aAA	1,66 aAA	1,57 aBA	1,04 bCB	1,64 aAA	1,22 bCB	0,59 cDC	1,74 aAA
9	1,66 aBA	1,25 bBA	1,74 aAA	1,38 bCB	0,75 cDB	1,74 aAA	1,25 bCB	0,64 cDB	1,59 aAA
16	1,69 aBA	1,35 bBA	1,89 aAA	1,59 bBA	1,09 cCB	1,86 aAA	1,68 aBA	1,18 bCB	1,76 aAA
23	1,64 aBA	1,63 aAA	1,76 aAA	1,66 aBA	1,38 bBB	1,80 aAA	1,70 aBA	1,43 bBB	1,70 aAA
30	1,89 aAA	1,74 aAA	1,82 aAA	1,93 aAA	1,75 aAA	1,86 aAA	1,94 aAA	1,66 bAA	1,80 aAA
Produção de grãos									
2	13,90 aAA	10,81 aAA	14,87 aAB	8,54 aBA	5,47 aAA	11,57 aAB	1,84 bBB	0,01 bBB	25,75 aAA
9	16,25 aAA	5,10 bBA	18,70 aAA	7,39 bBB	0,02 cAA	16,16 aAA	2,89 bBB	0,02 bBA	17,28 aBA
16	9,18 aBA	0,46 bBA	12,62 aAB	6,53 bBA	1,41 bAA	15,80 aAB	8,16 bBA	0,01 cBA	21,37 aAA
23	8,46 aBA	1,84 bBA	11,09 aAB	8,83 aBA	2,02 bAA	13,17 aAB	6,31 bBA	1,37 bBA	17,67 aBA
30	14,24 aAB	8,74 bAA	14,61 aAB	19,34 aAA	6,49 bAA	15,65 aAB	21,95 aAA	7,32 bAA	24,17 aAA

(1) Idade das plantas (dias após a emergência) no momento em que foram submetidas a cigarrinhas sadias ou infectantes com mollicutes.

(2) Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, dentro de cada tratamento inseticida e na testemunha, e letra maiúscula destacada nas linhas, para um mesmo fator de inoculação, entre os tratamentos inseticidas e a testemunha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Fonte: Oliveira et al. (2007).

Perdas em produtividade de grãos, em geral, foram maiores, para os dois produtos, quando as plantas foram submetidas às cigarrinhas infectantes aos nove, 16 e 23 DAE. Provavelmente as perdas menores observadas aos dois e aos 30 DAE foram consequência do efeito dos inseticidas, reduzindo a infecção com mollicutes aos dois DAE, e da infecção tardia que ocorreu aos 30 DAE, uma vez que infecções tardias causam menores danos à produção (HRUSKA; PERALTA, 1997; MASSOLA JÚNIOR et al., 1999).

Apesar de o experimento em condições controladas ter demonstrado que os inseticidas imidacloprid e thiamethoxan podem conferir certo grau de prevenção da infecção por mollicutes, sobretudo nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura, no experimento em campo, a utilização desses produtos, em tratamento de sementes ou em pulverizações, não resultou em redução significativa na incidência dos enfezamentos e aumento da produção (OLIVEIRA et al., 2007). Entre as causas desse insucesso, deve-se considerar a possível migração contínua de cigarrinhas infectantes, de lavouras de milho adjacentes, para a área experimental, visto que esse inseto-vetor possui atividade migratória (OLIVEIRA et al., 2013, 2015). Por outro lado, o efeito do tratamento de sementes com esses inseticidas, causando morte de cigarrinhas infectantes antes da transmissão dos mollicutes para as plântulas de milho, verificado em condições controladas, indica possibilidade de obtenção de benefício desse controle em campo, ao menos em certas situações, sendo necessários mais estudos para essa avaliação.

Características da transmissão dos mollicutes por *Dalbulus maidis* e implicações para o manejo dos enfezamentos

A transmissão de fitopatógenos por insetos-vetores, do tipo persistente e propagativa (NAULT, 1997), envolve quatro fases principais: aquisição, latência, inoculação e retenção no vetor (para detalhes, ver [Capítulo 10](#) deste livro). Essas fases ou períodos são dependentes da temperatura, e são variáveis em função dos fitopatógenos e vetores envolvidos. Entretanto, a fase de inoculação ou período de acesso à inoculação (PAI) parece ser fundamental para o sucesso ou não de medidas de manejo do vetor e das doenças por ele disseminadas. O PAI é entendido como o tempo necessário para que o inseto-vetor (já infectante) se alimente em planta sadia e inocule o fitopatógeno, e pode variar de alguns segundos a vários minutos ou horas, dependendo da relação fitopatógeno/vetor. Assim, no caso do controle químico o tempo necessário para o inseticida causar a morte do vetor deve ser inferior ao PAI para evitar que o inseto consiga transmitir o(s) fitopatógeno(s) antes de morrer.

No caso de *D. maidis*, a inoculação do fitoplasma em milho se dá a partir de 0,5 hora de alimentação (LEGRAND; POWER, 1994) e para o espiroplasma a inoculação ocorre após 1 hora de alimentação (MARKHAM; ALIVIZATOS, 1983), embora a eficiência de transmissão aumente acentuadamente e proporcionalmente ao tempo de alimentação do vetor. Assim, para *D. maidis* o controle químico impedirá a transmissão dos mollicutes se a morte das cigarrinhas ocorrer antes desses períodos de tempo.

Resultados da inoculação de espiroplasma em híbridos de milho-pipoca e de milho para produção grãos, ambos suscetíveis, usando uma e três cigarrinhas e diferentes períodos de

acesso à inoculação (PAI), são apresentados na Tabela 4. A obtenção de menor número de plantas infectadas quando o PAI foi de apenas 1 hora e, em geral, quando foi utilizada apenas uma cigarrinha infectante, evidencia que, embora a plântula de milho possa ser infectada muito rapidamente, a redução na quantidade de cigarrinhas infectantes pode reduzir o número de plantas doentes. A diferença observada entre os dois híbridos quando o PAI foi de 1 hora permite supor que o tempo de alimentação ou a quantidade de cigarrinhas se alimentando, necessários para infectar cultivares de milho com diferentes níveis de resistência ao patógeno, poderiam ser variáveis e possivelmente também dependentes da “carga de inóculo” dessas cigarrinhas. Esses fatores poderiam talvez afetar diferentemente a efetividade do controle químico da cigarrinha para controle dos enfezamentos.

Tabela 4. Plantas de milho-pipoca e de milho para produção de grãos, em vasos, com sintomas de enfezamento pálido, aos 60 dias da semeadura, submetidas à inoculação com espiroplasma através do confinamento de uma ou de três cigarrinhas, por diferentes períodos de tempo.

Milho	Número de cigarrinha por vaso	Tempo (h)			Total	(%)
		1	24	48		
Híbrido pipoca	1	3/5	2/5	3/5	8/15	53
Híbrido grão	1	0/5	3/5	3/5	6/15	40
Híbrido pipoca	3	2/5	5/5	5/5	12/15	80
Híbrido grão	3	4/5	4/5	3/5	11/15	70

Os estudos de controle químico de *D. maidis*, no Brasil, acima mencionados, demonstraram que, em geral, inseticidas neonicotinoides são capazes de causar mortalidade elevada de populações de *D. maidis* por períodos relativamente longos. Contudo, Oliveira et al. (2007) verificaram que, em viveiro telado, a proteção desses produtos, reduzindo sintomas e também os danos pelos enfezamentos, só ocorre quando os inseticidas são usados nos estádios iniciais de desenvolvimento das plântulas de milho. Por outro lado, efeitos benéficos dessa proteção ainda não foram confirmados em experimentos em campo.

Embora as informações obtidas nesses estudos de controle químico de *D. maidis* em milho não nos permitam afirmar que o uso de inseticidas garante a redução dos prejuízos provocados pelos enfezamentos, acreditamos que esse método de controle pode ser uma ferramenta auxiliar no manejo do vetor e dessas doenças na cultura milho. Inseticidas poderiam ser usados em tratamento de sementes para a proteção inicial das plântulas. Dessa prática pode-se esperar redução nas populações inicial e final da cigarrinha *D. maidis* em uma lavoura de milho e, se utilizada em todas as lavouras de uma região, redução desse inseto-vetor nessa região. Da diminuição na densidade populacional do inseto-vetor pode-se esperar redução na transmissão dos agentes causais dos enfezamentos, se não imediata, ao menos para as lavouras subsequentes. Entretanto, é importante considerar a atividade migratória dessa cigarrinha, que tem apenas o milho como hospedeiro, e lembrar também que os enfezamentos são doenças monocíclicas, essencialmente dependentes do inóculo inicial na área, e que quanto mais jovens

as plântulas de milho são infectadas pelos agentes causais piores são os danos, identificáveis apenas na fase de produção.

Mais estudos são necessários para avaliar o efeito de pulverizações de cultivos comerciais de milho, nos estádios iniciais de desenvolvimento das plântulas, com inseticidas sistêmicos e protetores no controle dos enfezamentos em diferentes ambientes.

Referências

- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 23 jun. 2015.
- ALBUQUERQUE, F. A. D.; BORGES, L.; IACONO, T. D. O.; CRUBELATI, N. C. D. S.; SINGER, A. D. C. Eficiência de inseticidas aplicados em tratamento de sementes e em pulverização, no controle de pragas iniciais do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 5, n. 1, p. 15-25, 2006.
- BHIRUD, K. M.; PITRE, H. N. Bioactivity of systemic insecticides in corn: relations to leafhopper vector control and corn stunt disease incidence. **Journal of Economic Entomology**, v. 65, n. 4, p. 1134-1140, 1972.
- HRUSKA, A. J.; PERALTA, M. G. Maize response to corn-leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) infestation and achaparramiento disease. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, p. 604-610, 1997.
- LEGRAND, A. I.; POWER, A. G. Inoculation and acquisition of maize bushy stunt mycoplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals of Applied Biology**, v. 125, p. 115-122, 1994.
- MARKHAM, P. G.; ALIVIZATOS, A. S. The transmission of corn stunt spiroplasma by natural and experimental vectors. In: INTERNATIONAL MAIZE VIRUS DISEASE COLLOQUIUM AND WORKSHOP, 1982, Wooster, Ohio. **Proceedings...** Wooster: The Ohio State University: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1983. p. 56-61.
- MARTINS, G. M.; TOSCANO, L. C.; TOMQUELSKI, G. V.; MARUYAMA, W. I. Eficiência de inseticidas no controle de *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) na cultura do milho. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 4, p. 196-200, 2008.
- 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**, v. 24, p. 136-142, 1999.
- NAULT, L. R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. **Annals of the Entomological Society America**, v. 90, n. 5, p. 521-541, 1997.
- OLIVEIRA, C. M. de. **Varição genética entre populações de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae) e mecanismos de sobrevivência na entressafra do milho**. 2000. 167 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- OLIVEIRA, C. M. de; OLIVEIRA, E. de; CANUTO, M.; CRUZ, I. Controle químico da cigarrinha-do-milho e incidência dos enfezamentos causados por mollicutes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 297-303, mar. 2007.
- OLIVEIRA, C. M. de; OLIVEIRA, E. de; CANUTO, M.; CRUZ, I. Eficiência de inseticidas em tratamento de sementes de milho no controle da cigarrinha *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) em viveiro telado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 231-235, jan./fev. 2008.
- OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.
- OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R.; NAULT, L. R. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 147, n. 2, p. 141-153, May 2013.
- OLIVEIRA, E. de; TERNES, S.; VILAMIU, R.; LANDAU, E. C.; OLIVEIRA, C. M. Abundance of the insect vector of mollicutes in the vegetative maize cycle. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, p. 117-118, 2015.
- PEDIGO, L. P. Conventional insecticides. In: PEDIGO, L. P. (Ed.). **Entomology and pest management**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p. 373-431.

PERFECTO, I. Indirect and direct effects in a tropical agroecosystem: the maize-pest-ant system in Nicaragua. **Ecology**, v. 71, n. 6, p. 2125-2134, 1990.

TSAI, J. H.; STEINBERG, B.; FALK, B. W. Effectiveness and residual effects of seven insecticides on *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) and *Peregrinus maidis* (Homoptera: Delphacidae). **Journal of Entomological Science**, v. 25, p. 106-111, 1990.

WAQUIL, J. M.; CRUZ, I. Impacto do tratamento de sementes de milho na infestação por *Dalbulus maidis* e Spodoptera frugiperda. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 20., 1994, Goiânia. **Centro-Oeste: cinturão do milho e do sorgo no Brasil: resumos**. Goiânia: ABMS, 1994. p. 153.

Capítulo 8

Controle biológico de *Dalbulus maidisno Brasil* - Uma visão geral sobre os parasitoides

Ranyse Barbosa Querino | Aurélio Ribeiro Meneses | Erica Luft Albarracin | Charles Martins de Oliveira | Serguei Triapitsyn



Introdução

A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) é a espécie mais comum entre os cicadélídeos na cultura desse cereal, em razão da sua íntima associação ao milho cultivado, ocorrendo em toda a região neotropical (TRIPLEHORN; NAULT, 1985). Esta espécie tem sido

coletada e registrada nos Estados Unidos, no México, na América Central, na América do Sul, e nas ilhas no Caribe (NIELSON, 1968; WILSON; TURNER, 2010).

A origem de *D. maidis* pode ser rastreada até os teosintos parentes do milho. Todos os membros do gênero *Dalbulus* DeLong usam o milho e os teosintos (*Zea* spp.), ou gramíneas proximamente relacionadas (*Tripsacum* spp.), como seus hospedeiros primários (NAULT, 1990). A adoção do milho como hospedeiro por *D. maidis*, parece ter ocorrido quando o milho foi domesticado dos seus primeiros parentes teosintos, influenciando sua biologia e comportamento (NAULT, 1990).

A cigarrinha-do-milho é considerada uma das mais sérias pragas do milho na América Latina, porque ela transmite três agentes patogênicos do milho, o *corn stunt Spiroplasma* (CSS) (*Spiroplasma kunkelii*), *Maize bushy stunt phytoplasma* (MBSP), e *Maize rayado fino virus* (MRFV) (NAULT, 1980, 1990; OLIVEIRA et al., 1998). *Dalbulus maidis* foi a única espécie de *Dalbulus* encontrada entre os 4.661 indivíduos amostrados em 27 localidades brasileiras (OLIVEIRA et al., 2004).

No Brasil, as perdas das lavouras causadas por este vetor têm sido maiores na região Centro-Sul, especialmente nos plantios do final do verão (janeiro a abril) ou durante o segundo cultivo (OLIVEIRA et al., 2002). Por outro lado, há uma lacuna de conhecimento sobre as perdas na colheita em outras regiões do Brasil, bem como sobre a ocorrência de insetos-vetores, fitoplasmas e vírus, em cultivos de milho na região Nordeste do País.

Inimigos naturais de *D. maidis* têm sido intensivamente investigados em outros países, tais como Argentina e México, especialmente em

relação aos parasitoides. Estes são antagonistas que podem ser divididos dentro de duas guildas: aqueles que atacam ovos, e os que parasitam ninfas e adultos. Os principais parasitoides de ovos de *D. maidis* pertencem a Mymaridae e Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), enquanto aqueles que atacam ninfas e adultos são espécies de Dryinidae (Hymenoptera), Pipunculidae (Diptera) e Strepsiptera. No Sudeste do Brasil, *Anagrus breviphragma* Soyka (Mymaridae) e *Oligosita* sp. (Trichogrammatidae) foram registrados como parasitoides de ovos de *D. maidis* (TRIAPITSYN, 1997; OLIVEIRA; LOPES, 2000).

No Nordeste do Brasil, pesquisas sobre a incidência de *D. maidis*, de mollicutes e viroses, e de seus parasitoides, foram iniciadas recentemente, e os parasitoides desta cigarrinha têm sido descobertos. Este capítulo fornece uma breve sinopse das associações de parasitoides com a cigarrinha-do-milho.

Parasitoides de ninfas e adultos de *Dalbulus maidis*

Pipunculidae (Diptera)

Os Pipunculidae são comumente conhecidos como moscas cabeça-grande. A maioria dos pipunculídeos estudados são endoparasitoides de várias famílias de Hemiptera (Auchenorrhyncha), incluindo Cicadellidae, Cercopidae, Delphacidae, Membracidae, Issidae, Cixiidae e Flatidae (RAFAEL; SKEVINGTON, 2010). De acordo com estes autores, o potencial valor de Pipunculidae para o controle biológico tem estimulado

trabalhos sobre a bionomia de alguns membros desta família, por exemplo, aqueles que parasitam a cigarrinha-da-batata, *Empoasca fabae* (Harris), a principal praga de alfafa no Meio-Oeste e Leste dos EUA e Canadá. Fêmeas de muitas espécies de pipunculídeos depositam seus ovos nos primeiros instares ninfais ou nos adultos de hospedeiros, e as larvas desenvolvem-se até a maturidade dentro das ninfas ou dos adultos hospedeiros (RAFAEL; SKEVINGTON, 2010).

As associações com hospedeiros conhecidas para alguns pipunculídeos da região neotropical são todos relatos recentes. No México, *Eudorylas (Metadorylas) absconditus* Hardy foi identificado como um parasitoide de *D. maidis* e *D. elimatus* (Ball). Estes parasitoides foram coletados sobre plântulas de milho em Santa Catarina del Monte (2.545 m acima do nível do mar) e em San Diego (2.250 m acima do nível do mar), ambos no município de Texcoco, no México (VEGA et al., 1991). Os sintomas de parasitismo incluem um abdomen extremamente inflado; em alguns espécimes foi quase o dobro do tamanho de insetos não parasitados. Outro caso da associação hospedeira com adultos de *D. maidis* no México foi de *Eudorylas (Metadorylas) spinosus* Hardy (MOYA-RAYGOZA et al., 2004) e *Eudorylas subopacus* (Loew) sobre milho de inverno (MOYA-RAYGOZA, 2007). *Cephalops penepauculus* (Hardy) foi criado de *Metadelphax propinqua* (Fieber) e *Dicranotropis fuscoterminada* Berg (Delphacidae), na Argentina (VIRLA; RAFAEL, 1996). O pipunculídeo *Eudorylas schreiteri* (Shannon) foi registrado pela primeira vez como um endoparasitoide de *D. maidis*, no nordeste da Argentina (VIRLA et al., 2009c). *Eudorylas absconditus*, *E. schreiteri* e *E. spinosus* ocorre no Brasil (RAFAEL, 1990), mas eles não têm sido registrados como parasitoides de *D. maidis*.

Dryinidae (Hymenoptera)

Os Dryinidae são uma pequena família cosmopolita de Hymenoptera: Aculeata que parasita vários Auchenorrhyncha. A família é composta por pequenas vespas que são facilmente distinguidas dos outros membros da Chrysidoidea pela presença de antenas 10-segmentada que estão inseridas próximo do clipeo, e pelo fato das fêmeas terem pró-tarso quelato (exceto para a subfamília Aphelopinae) composto por garras hipertrofiadas e expansões laterais do quinto tarsômero. Algumas fêmeas são braquípteras ou ápteras. O dimorfismo sexual na família é tão forte que os sexos opostos não são reconhecíveis (OLMI et al., 2000).

As fêmeas de muitas espécies de Dryinidae são semelhantes às formigas, em sua aparência geral. Este mimetismo lhe permite atacar facilmente os seus hospedeiros, porque as formigas alimentam-se com frequência do líquido açucarado produzido por muitas espécies de Auchenorrhyncha, defendendo-os, assim, dos inimigos naturais. Este fenômeno foi observado principalmente nas fêmeas ápteras de gênero *Gonatopus* Ljungh (Gonatopodinae) (GUGLIELMINO, 2002).

O conhecimento da ecologia e biologia das vespas Dryinidae é insuficiente, especialmente em relação às suas interações hospedeiro-parasitoide. Geralmente os Dryinidae são parasitoides e predadores de seus hospedeiros, algumas vezes muito efetivos para o controle biológico natural de pragas (GUGLIELMINO, 2002). Os Dryinidae não são parasitoides monoespecíficos; pelo contrário, eles podem parasitar muitas espécies hospedeiras pertencentes a diferentes gêneros, em alguns casos, também a diferentes famílias. Registros publicados de parasitismo monoespecífico em Dryinidae

parecem ser apenas o resultado de uma pesquisa insuficiente (GUGLIELMINO et al., 2013).

Seis espécies *Gonatopus* têm sido associadas a *Dalbulus* (incluindo *D. maidis*) na região neotropical, com a maioria dos registros na Argentina e no México (GUGLIELMINO et al., 2013 ; OLMÍ; VIRLA, 2014): *G. bartletti* Olmi, *G. caraibicus* (Olmi), *G. contortus* Olmi, *G. desantisi* Olmi & Virla, *G. flavipes* Olmi, *G. moyaraygozai* Olmi (Tabela 1).

Tabela 1. Dryinidae e seus hospedeiros registrados a partir da região neotropical e na parte neártica.

País	Espécie de Dalbulus hospedeira	Drynidae parasitoide	Referência
Mexico	<i>D. elimatus</i> (Ball)	<i>Gonatopus bartletti</i> Olmi	Vega (1989a, 1989b, 1989c); Vega e Barbosa (1990); Virla e Olmi (1998)
	<i>D. elimatus</i> (Ball)	<i>Gonatopus flavipes</i> Olmi	Moya-Raygoza (1990, 1993), Moya-Raygoza e Trujillo-Arriaga (1993a, 1993b), Virla e Olmi (1998)
	<i>D. quinquenotatus</i> DeLong & Nault	<i>Anteon ciudadi</i> Olmi	Moya-Raygoza (1990, 1993, 1994), Olmi (1991), Moya-Raygoza e Trujillo-Arriaga (1993a, 1993b)
	<i>D. quinquenotatus</i> DeLong & Nault	<i>Gonatopus moyaraygozai</i> Olmi	Moya-Raygoza (1990, 1993, 1994), Olmi (1991), Moya-Raygoza e Trujillo-Arriaga (1993a, 1993b)
	<i>D. maidis</i>	<i>Gonatopus bartletti</i> Olmi	Vega (1989a, 1989b, 1989c), Vega e Barbosa (1990), Moya-Raygoza (1990), Moya-Raygoza e Trujillo-Arriaga (1993a, 1993b), Virla e Olmi (1998), Guglielmino et al. (2006)
Nicarágua	<i>D. maidis</i>	<i>Gonatopus bartletti</i> Olmi	Guglielmino e Olmi (1997), Virla e Olmi (1998)
Porto Rico	<i>D. maidis</i>	<i>Gonatopus bartletti</i> Olmi	Bartlett (1939), Olmi (1984), Virla e Olmi (1998)
Argentina	<i>D. maidis</i>	<i>Anteon pilicorne</i> (Ogloblin)	Virla et al. (2011)
	<i>D. maidis</i>	<i>Gonatopus caraibicus</i> (Olmi)	Virla (1992), Virla e Olmi (1998).
	<i>D. maidis</i>	<i>Gonatopus contortus</i> (Olmi)	Virla e Olmi (2007)
	<i>D. maidis</i>	<i>Gonatopus desantisi</i> Olmi & Virla	Virla (1992), Virla e Olmi (1998)

	<i>D. maidis</i>	<i>Gonatopus moyaraygozai</i> Olmi	Virla e Olmi (2007)
Brasil	<i>D. maidis</i>	<i>Gonatopus flavipes</i> Olmi	Olmi e Virla, 2014
Venezuela	<i>D. maidis</i>	<i>Gonatopus bartletti</i> Olmi	Guglielmino e Olmi (1997).

Fonte: Guglielmino et al. (2013).

No Brasil, *G. contortus* foi capturado em Belo Horizonte, Minas Gerais, em armadilhas de bandeja amarela (OLMI; VIRLA, 2014), e *G. flavipes* foi criado de *D. maidis* em milho, em Teresina, no Piauí por A. R. Meneses e R. B. Querino; a mesma espécie foi coletada em Santa Catarina, no município de Nova Teutônia, e também em Barueri e Miracatu, em São Paulo (OLMI, 1984; OLMI; VIRLA, 2014).

Outra vespa Dryinidae, *Anteon pilicorne* (Ogloblin) (Anteoninae), também foi registrado como parasitoide da cigarrinha-do-milho, na Argentina (VIRLA et al., 2011). Ele tem uma ampla distribuição na América Latina, incluindo o Brasil (OLMI; VIRLA, 2014).

De acordo com Moya-Raygoza e Trujillo-Arriaga (1993a, 1993b), a associação mais primitiva de uma espécie de *Dalbulus* e seu parasitoide Dryinidae é entre *D. quinquenotatus* DeLong & Nault e *Anteon ciudadi* Olmi em forrageira (*Tripsacum* spp.), em habitats com uma relativamente baixa perturbação ambiental. Eles sugerem que esta associação tenha iniciado antes do gênero *Dalbulus* ter se diversificado e quando *Tripsacum* sofreu uma ativa especiação. A associação dos Dryinidae *Gonatopus bartletti*, *G. flavipes*, e *G. moyaraygozai* e seus respectivos hospedeiros *D. maidis*, *D. elimatus*, e *D. quinquenotatus*, provavelmente, iniciou-se ao mesmo

tempo, quando os teosintos perenes foram evoluindo a partir de capins forrageiros, que mais tarde deram origem aos teosintes anuais.

Halictophagidae (Strepsiptera)

Strepsiptera são parasitoides entomófagos incomuns que apresentam dimorfismo sexual extremo e têm machos de vida livre e fêmeas endoparasitas, exceto na família Mengenillidae, em que as fêmeas são de vida livre (KATHIRITHAMBY, 2009). Os machos têm olhos grandes parecidos com framboesa, antenas flabeladas, asas anteriores curtas e asas posteriores grandes. As fêmeas são neotênicas e, com exceção de um cefalotórax extrusado, o resto do corpo é parecido com um saco (KATHIRITHAMBY, 2005).

Parasitismo ocorre no estágio larval/ninfal do hospedeiro e continua no hospedeiro móvel até o estágio adulto do Strepsiptera. A vida do hospedeiro é alongada para permitir que o macho de Strepsiptera complete a maturação e a fêmea vivípara possa liberar as larvas do primeiro instar quando a próxima geração das larvas do hospedeiro/ninfas for produzida (KATHIRITHAMBY, 2009).

Em Halictophagidae, duas espécies de *Halictophagus* Curtis foram registradas a partir de Cicadellidae: *Halictophagus naulti* Kathirithamby & Moya-Raygoza, que é um parasitoide da cigarrinha-do-milho, e *H. acutus* Bohart, que tem como hospedeiro *Draeculacephala minerva* Ball e *D. mollipes* (Say) (KATHIRITHAMBY, 2005).

Dalbulus maidis parasitados por *H. naulti* foram coletados em milho, em 1994, em Tlaltizapán, Morelos, México; as ninfas *stylopized*

foram criadas individualmente em plantas de milho para se obter adulto *H. naulti*, a partir do qual foram coletados três machos, e várias fêmeas desse parasitoide (KATHIRITHAMBY; MOYA-RAYGOZA, 2000). *H. naulti* foi também encontrado parasitando *D. elimatus* e *D. gelbus* DeLong; sobre os adultos de *D. maidis*, tiveram uma taxa média de parasitismo de 5% (SE \pm 2,3) (MOYA-RAYGOZA et al., 2004).

Estas descobertas expandiram a lista de parasitoides conhecidos de *Dalbulus* spp., e suportam a hipótese de que um elevado número de parasitoides endêmicos poderia ser encontrado no centro de origem de *D. maidis* (MOYA-RAYGOZA et al., 2004).

Parasitoides de ovos de *Dalbulus maidis*

As pesquisas sobre os parasitoides de ovos de *Dalbulus* têm evoluído muito nos últimos anos, especialmente onde as cigarrinhas *D. maidis* causam grandes problemas como vetores de agentes causais de doenças de milho, em particular na Argentina, no México e no Brasil (Tabela 2).

Aphelinidae (Hymenoptera)

Aphelinidae é uma das menores famílias de Chalcidoidea. Eles são de pequenos a minúsculos, com o menor comprimento de corpo de 2 mm ou menos; o corpo nunca é fortemente metálico, geralmente pálido e levemente esclerotizado. Muitos Aphelinidae são primários parasitoides ou hiperparasitoides de Hemiptera (principalmente, Sternorrhyncha), embora espécies em vários gêneros sejam

conhecidas por parasitar ovos de insetos, em várias ordens (WOOLLEY, 1997).

Encarsia dalbulae Polaszek & Luft Albarracin foi descrita a partir de ovos de *D. maidis*, na Argentina (POLASZEK; LUFT ALBARRACIN, 2011). Essa foi a primeira vez que alguma espécie *Encarsia* Förster foi registrada emergindo de ovos da cigarrinha. É uma espécie rara, obtida apenas em algumas ocasiões de ovos de *D. maidis*, e sempre em pequenas quantidades (POLASZEK; LUFT ALBARRACIN, 2011). Até agora, é conhecida apenas na Argentina, e apenas do sexo masculino.

Eulophidae (Hymenoptera)

Os membros de Eulophidae são reconhecidos pelos seus tarsos 4-segmentados, um esporão pró-tibial curto e reto, flagelo geralmente com 2 a 4 segmentos funiculares, corpo pequeno a moderadamente grande (0,4 mm a 6,0 mm), mas raramente mais do que 3 mm. Há um notável grau de diversidade na sua biologia. Eulophidae são predominantemente parasitoides de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hymenoptera. No entanto, muitos outros hospedeiros são utilizados. Muitos Eulophidae são parasitoides de hospedeiros escondidos em tecido vegetal (SCHAUFF et al., 1997).

Aprostocetus (Ootetrastichus) infulatus (De Santis) (Tetrastichinae) foi coletado na Província de Buenos Aires, Argentina, por varredura em um pasto selvagem, mas Luft Albarracin e Triapitsyn (2007) relataram como parasitoide de ovos de *D. maidis* em folhas de plantas sentinelas de milho.

De acordo com Luft Albarracin e Triapitsyn (2007), *A. (O.) infulatus* é economicamente importante na Argentina, uma vez que seus hospedeiros incluem vetores de agentes causais de doenças de milho, como a cigarrinha-do-milho e *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Delphacidae).

Mymaridae (Hymenoptera)

Mymaridae são delicados chalcidoideos de corpo esbelto, minúsculos a pequenos (comprimento do corpo 0,2 mm a 2,5 mm; média 0,5 mm a 1,0 mm), pretos, marrons ou amarelos, sem coloração metálica, geralmente alados, mas algumas vezes com asas curtas ou sem asas. As formas aladas têm longas cerdas marginais e com asa posterior quase sempre muito estreita e pedunculada basalmente (HUBER, 1997, 2006).

Mymaridae é uma família cosmopolita com espécies que são encontrados em todos os habitats terrestres, dos desertos a florestas, campos, em ambientes aquáticos como lagoas, e em uma gama de altitudes. Todos são parasitoides idiobiontes de ovos de insetos; aparentemente, a maioria é parasitoide solitário de ovos, mas há espécies gregárias. Os hospedeiros primários são Coleoptera (especialmente Curculionidae, Chrysomelidae, e Dytiscidae), Hemiptera (Cicadellidae, Delphacidae, Cercopidae, Miridae, Membracidae, Tingidae, etc.), Psocoptera, Odonata (Anisozygoptera e Zygoptera), e alguns Orthoptera, mas muitos registros dos hospedeiros são de ovos de Auchenorrhyncha (Hemiptera) (HUBER, 1997, 2006; NOYES, 2015). Pelo fato de alguns de seus hospedeiros serem pragas agrícolas ou florestais, os Mymaridae são considerados insetos benéficos; várias espécies têm

sido utilizadas com sucesso em programas de controle biológico de insetos-praga (CLAUSEN, 1940).

A partir dos registros de hospedeiros disponíveis, relativamente pouco confiáveis, parece que a maioria dos Mymaridae não são espécies-específicas. Muitos parecem ser, pelo menos, gênero-específico, e algumas espécies são conhecidas por parasitar hospedeiros em várias famílias de uma única ordem, ou, por vezes, até mesmo possivelmente em mais de uma ordem de insetos. Cerca de três quartos dos registros de hospedeiros são para os seis maiores e economicamente mais importante gêneros:

Cosmocomoidea Howard, *Gonatocerus* Nees, *Lymaenon* Walker, *Polynema* Haliday, *Anaphes* Haliday, e *Anagrus* Haliday (HUBER, 1997, 2006).

Sete espécies de Mymaridae são conhecidas de ovos de *D. maidis*: *Anagrus breviphragma* Soyka, *A. flaveolus* Waterhouse, *A. miriamae* Triapitsyn & Virla, *A. nigriventris* Girault, *Polynema* sp. próxima a *P. uruguayensis* Özdikmen, *Polynema* sp. próxima a *P. reticulatum* (Ogloblin), e *P. saga* (Girault) (Tabela 2).

Tabela 2. Lista de associações conhecidas entre *Dalbulus maidis* e seus parasitoides de ovos (uma compilação dos registros publicados).

Família	Espécie de parasitoide	País	Referência
Aphelinidae	<i>Encarsia dalbulae</i> Polaszek & Luft Albarracin	Argentina	Polaszek e Luft Albarracin (2011)
Eulophidae	<i>Aprostocetus (Ootetrastichus) infulatus</i> De Santis	Argentina	Luft Albarracin e Triapitsyn (2007)
Mymaridae	<i>Anagrus breviphragma</i> Soyka	Argentina, Brasil, Colômbia, México	Triapitsyn (1997, 2000), Oliveira e Lopes (2000), Virla (2001)
	<i>Anagrus flaveolus</i> Waterhouse	Argentina, Peru	Marín (1987), Triapitsyn (1997)
	<i>Anagrus miriamae</i> Triapitsyn & Virla	Argentina	Moya-Raygoza et al. (2012)
	<i>Anagrus nigriventris</i> Girault	Argentina	Luft Albarracin et al. (2006)
	<i>Polynema</i> sp. near <i>P. uruguayensis</i> Özdikmen	Argentina	Moya-Raygoza et al. (2012)
	<i>Polynema</i> sp. near <i>P. reticulatum</i> (Ogloblin)	Argentina	Moya-Raygoza et al. (2012)
	<i>Polynema saga</i> (Girault)	México	Moya-Raygoza et al. (2012)
Trichogrammatidae	<i>Aphelinoidea semifuscipennis</i> Girault	México	Moya-Raygoza et al. (2012)
	<i>Burksiella platensis</i> (De Santis)		Luft Albarracin et al. (no prelo)
	<i>Oligosita</i> sp.	Argentina, Brasil	Oliveira e Lopes (2000), Luft Albarracin et al. (2005)
	<i>Oligosita clarimaculosa</i> (Girault)	México	Moya-Raygoza et al. (2012)
	<i>Oligosita desantisi</i> Viggiani	Argentina	Moya-Raygoza et al. (2012)

Família	Espécie de parasitoide	País	Referência
	<i>Oligosita giraulti</i> Crawford	Argentina	Moya-Raygoza et al. (2012)
	<i>Paracentrobia</i> sp.	Argentina	Luft Albarracin et al. (2005)
	<i>Paracentrobia subflava</i> (Girault)	Argentina	Virla (1999)
	<i>Paracentrobia tapajosae</i> Viggiani (= <i>Paracentrobia</i> sp.; <i>Paracentrobia</i> nr. <i>subflava</i>)	Argentina, México	Virla (1999), Luft Albarracin et al. (2005), Moya-Raygoza et al. (2012)
	<i>Pseudoligosita longifragiata</i> (Viggiani)	Argentina, México	Moya-Raygoza et al. (2012)
	<i>Zagella</i> sp.	Argentina	Luft Albarracin et al. (2005)
	<i>Zagella nanula</i> De Santis (= <i>Zagella</i> sp.)	Argentina	Luft Albarracin et al. (ca 2017)

Os registros de Mymaridae obtidos de ovos de *D. maidis* são, principalmente, da Argentina e do México, onde foram realizados levantamentos extensos. Os primeiros registros, no entanto, foram do Peru, relatados por Marín (1987), onde ela observou ovos de *D. maidis* parasitados por *A. flaveolus*, especialmente durante o verão, com o parasitismo variando entre 4,2% e 54,8%, dependendo da época de plantio; o parasitoide também foi criado a partir de ovos de *P. maidis*.

Entre as espécies descritas de *Anagrus*, que ocorrem na Argentina, *A. breviphragma*, *A. flaveolus*, *A. miriamae* e *A. nigriventris* são registradas como parasitoides de *D. maidis* (TRIAPITSYN, 1997; LUFT ALBARRACIN et al., 2006). *Anagrus nigriventris* foi responsável por 7,2% do total de parasitismo e é uma das quatro

espécies de *Anagrus* conhecidas por afetar as populações desta cigarrinha na Argentina (LUFT ALBARRACIN et al., 2006).

No Brasil, somente *A. breviphragma* foi registrado parasitando ovos de *D. maidis*, em Sete Lagoas, MG (TRIAPITSYN, 1997) e em Piracicaba, SP, onde o levantamento de parasitoides de ovos foi conduzido em dois plantios consecutivos de milho. O último registro de *A. breviphragma* com taxas de parasitismo de ovos de 22,4% e 33,3%, respectivamente (OLIVEIRA; LOPES, 2000). *Anagrus breviphragma* tem uma ampla distribuição e é uma espécie polífaga (VIRLA, 2001). Na América do Sul está associada com *D. maidis* também na Argentina e na Colômbia (TRIAPITSYN, 1997, 2002). É o parasitoide de ovos mais importante da cigarrinha-do-milho no México (VIRLA et al., 2009a; MOYA-RAYGOZA et al., 2012), onde foi encontrado atacando seus ovos em altitudes altas e baixas (MOYA-RAYGOZA et al., 2012). Esta espécie também foi registrada de ovos de *D. elimatus* (MOYA-RAYGOZA et al., 2014).

A. flaveolus e *A. nigriventris* ocorrem no Brasil (TRIAPITSYN, 1997, 2000), mas suas associações hospedeiras são desconhecidas. *Anagrus flaveolus* é uma espécie comum neotropical, que é economicamente importante para o controle biológico de uma cigarrinha (*D. maidis*) e de vários Delphacidae pragas na Argentina, particularmente sobre milho e cana-de-açúcar (TRIAPITSYN, 1997, 2002).

Espécies de *Polynema* têm sido encontradas parasitando ovos de *Dalbulus*, na Argentina e no México. *Polynema* sp., próximo a *P. uruguayensis* e *Polynema* sp., próximo a *P. reticulatum* foram registrados na Argentina, e *P. Saga*, no México (MOYA-RAYGOZA et al., 2012).

Na América Central, um *Anagrus* sp. foi registrado de ovos de *D. maidis* em milho, na Nicarágua (GLADSTONE et al., 1994).

Informações biológicas

Anagrus breviphragma é um dos parasitoides de ovos de *D. maidis* para o qual há mais informações biológicas disponíveis. De acordo com Virla (2001), *A. breviphragma* é solitário e pró-ovigênico (ou seja, sem um período pré--ovipositional). Essa vespa parasitou ovos que eram apenas de 1 a 3 dias de idade, e não foi capaz de amadurecer em ovos contendo embriões mais desenvolvidos. No laboratório, a média relatada de parasitismo foi de 66,5%. O tempo de desenvolvimento de *A. breviphragma* é em torno de 16,5 dias, e as fêmeas atingiram a fase adulta significativamente mais rápido do que os machos. Esta espécie também se desenvolveu mais rapidamente em ovos com um dia de idade do que nos ovos com dois dias de idade, e naqueles de dois dias de idade mais rápido do que em ovos de três dias de idade. A longevidade média dos adultos foi de 5 dias, enquanto alguns indivíduos sobreviveram mais de 12 dias; fêmeas viveram mais que os machos. A razão sexual observada mostrou um predomínio do sexo feminino sobre o masculino.

Trichogrammatidae (Hymenoptera)

A família Trichogrammatidae representa um grupo ubíquo de parasitoides de ovos de insetos, que está entre os Hymenoptera pouco conhecidos (PINTO, 2006). Tricogramatídeos são caracterizados pelos tarsos 3-segmentados, reduzido número de segmentos da antena, e uma estrutura de corpo compacto. Eles são

endoparasitoides primários de ovos de insetos de 10 ordens, no Novo Mundo (QUERINO et al., 2010). Hemiptera tem o maior número de gêneros associados, e Auchenorrhyncha são parasitados pelo maior número de gêneros de tricogramatídeos (PINTO, 1997).

A família permanece pouco conhecida na América Central e do Sul, com 37 e 41 gêneros conhecidos, respectivamente, e 28 gêneros ocorrendo no Brasil (QUERINO et al., 2010). A maioria dos registros da América do Sul é de espécies que são comumente usadas no controle biológico de lepidópteros-pragas (QUERINO et al., 2010). Recentemente, no entanto, outros gêneros de Trichogrammatidae têm recebido mais atenção da entomologia aplicada porque os seus membros parasitam importantes Cicadellidae vetores de agentes causais de doenças em culturas agrícolas.

Na Argentina, *Oligosita desantisi* Viggiani, *O. giraulti* Crawford, *Paracentrobia tapajosae* Viggiani e *Pseudoligosita longifrangjata* (Viggiani) foram registradas de ovos de *D. maidis* (MOYA-RAYGOZA et al., 2012; VIRLA et al., 2013). Recentemente, vários outros tricogramatídeos foram adicionados a essa lista: *Aphelinoidea* sp. A, *Burksiella platensis* (De Santis), e *Zagella nanula* De Santis (LUFT ALBARRACIN et al., ca 2017).

Até agora, apenas uma espécie de tricogramatídeos é conhecida no Brasil, de ovos de *D. maidis*, *Oligosita* sp. (em Piracicaba, SP), com taxas de parasitismo de 62% e 50% nos primeiro e segundo cultivos, respectivamente (OLIVEIRA; LOPES, 2000).

Os parasitoides de ovos tricogramatídeos registrados da cigarrinha-do-milho, no México, são *Aphelinoidea semifuscipennis* Girault, *Oligosita clarimaculosa* (Girault), *O. desantisi*, *P. tapajosae*, e *P. longifrangjata* (VIRLA et al., 2009a; MOYA-RAYGOZA et al., 2012,

2014). No entanto, as identificações das duas últimas espécies necessitam de verificação, e são provavelmente incorretas (MOYA-RAYGOZA; TRIAPITSYN, 2015).

Também no México, ovos-sentinela de *Dalbulus elimatus* foram expostos aos parasitoides de ovos, em habitats de milho sazonal e perene, onde foram parasitados por *P. tapajosae*, *A. semifuscipennis* e *P. longifrangata* (MOYA-RAYGOZA et al., 2014). De novo, a identificação de *P. tapajosae* e *P. longifrangata* necessita de verificação (MOYA-RAYGOZA; TRIAPITSYN, 2015).

Paracentrobia sp. também foi obtido de ovos de *D. maidis*, coletados em parcelas experimentais de milho em Manágua, na Nicarágua (GLADSTONE et al., 1994). Os autores estimaram que o combinado nível de parasitismo por *Anagrus* sp. e *Paracentrobia* sp. foi acima de 93%.

Informações biológicas

Paracentrobia subflava (Girault) foi encontrada parasitando ovos da cigarrinha *Exitianus obscurinervis* (Stål), na Argentina. Em condições de laboratório, *P. subflava* também parasitou ovos de *Amplicephalus simpliciusculus* Linnavuori, *D. maidis*, e *Haldorus sexpunctatus* Berg. De acordo com Virla (1999), a duração do ciclo de vida de *P. subflava* é aproximadamente 18 dias, dependendo do estágio de desenvolvimento do ovo hospedeiro. Fêmeas têm um período pré-reprodutivo de 30 a 40 dias; após esse tempo, elas põem seus ovos até a morte. No laboratório, adultos de *P. subflava* emergem de 15 a 25 dias após a oviposição. A razão sexual observada foi 1,4 fêmea para cada macho. Machos têm vida mais curta que as fêmeas (média de 8,7 e 11,3 dias, respectivamente).

P. tapajosae atacou ovos de *D. maidis* durante duas estações de cultivos do milho no México e na Argentina (MOYA-RAYGOZA et al., 2012) (no México, entretanto, parece um erro de identificação). A priori, estudos biológicos com o parasitoide primário de *Agalliana ensigera* Oman e *Tapajosa rubromarginata* (Signoret) (Cicadellidae: Cicadellini e Proconiini, respectivamente) por Virla et al. (2009b) identificaram que o ciclo de desenvolvimento de ovo a adulto foi de $21,3 \pm 2,3$ dias. A longevidade de adultos foi de $6,8 \pm 4,5$ dias, com fêmeas vivendo mais que os machos. A razão sexual, considerando somente fêmeas acasaladas, foi 1:2,2 (machos:fêmeas). Em condições de laboratório, *P. tapajosae* é um parasitoide facultativamente gregário. Como também registrado para *P. subflava* (VIRLA, 1999), *P. tapajosae* é capaz de ovipositar e desenvolver-se mesmo em um embrião do hospedeiro com avançado desenvolvimento e já olhos vermelhos visíveis (VIRLA et al., 2009b).

Novos registros de parasitoides de *Dalbulus maidis* no Nordeste do Brasil

Parasitoide de ovos

Parasitoides de ovos de *D. maidis* foram pesquisados em Teresina, PI, Nordeste do Brasil, por Meneses (2015). Vasos com plantas-sentinelas contendo ovos da cigarrinha-do-milho foram colocados em áreas de milho, para conhecer os parasitoides nativos de *D. maidis* e sua abundância sazonal.

Três espécies de parasitoides de duas famílias foram registradas: *A. breviphragma*, *P. subflava* e *P. longifrangata*.

Anagrus breviphragma Soyka, 1956 (Mymaridae) (Figura 1):





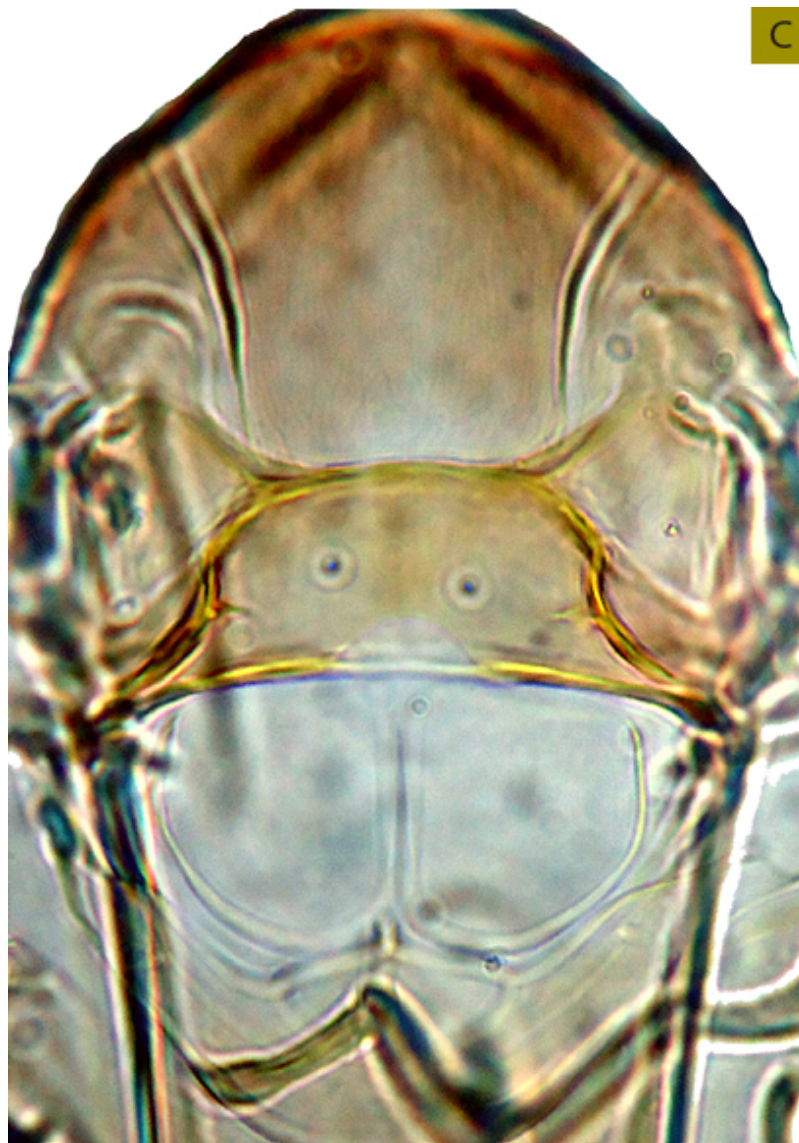


Figura 1. *Anagrus breviphragma*. Fêmea: vista lateral (A); detalhes da antena (B); *Mesoscutum* e *scutellum* (C) e asa anterior (D).

Fotos: Ranyse Barbosa Querino

- Diagnose – amarelo-alaranjado; mesoscuto sem cerdas adnotaular; asa anterior com uma área glabra; antena do sexo feminino com o segundo segmento funicular, o mais longo entre os segmentos do funículo, terceiro e quarto segmentos funiculares cada um com uma crista sensorial; ovipositor projetando do metasoma (CHIAPPINI et al., 1999).
- Distribuição no Brasil – Minas Gerais, São Paulo, Piauí.
- Hospedeiros – *Cicadella viridis* (L.), *Dalbulus maidis* (Cicadellidae); *Conomelus anceps* (Germar), *Delphacodes kuscheli* Fennah, *Dicranotropis hamata* (Boheman), *Muellerianella fairmairei* (Perris), *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Delphacidae); *Orthotylus virescens* (Douglas & Scott) (Miridae) (NOYES, 2015).

Paracentrobia subflava (Girault, 1911) (Trichogrammatidae:
Oligositinae: Paracentro-biini) (Figuras 2 e 3)





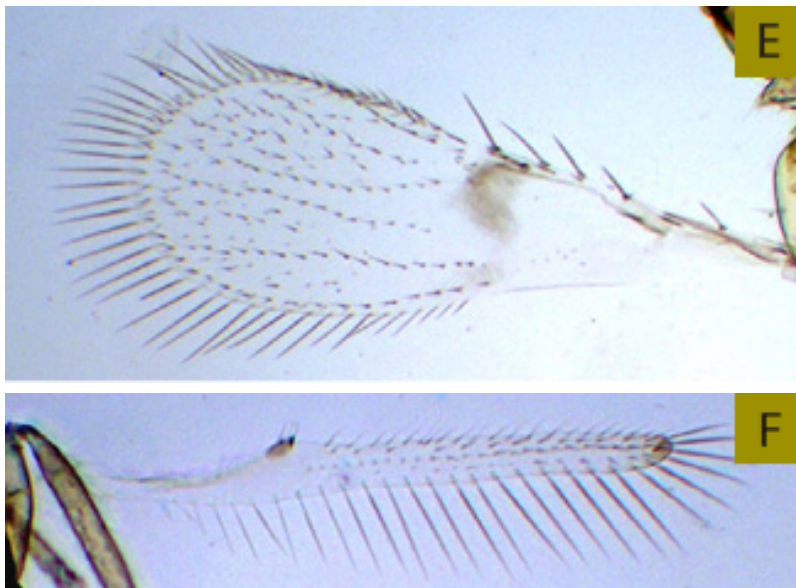


Figura 2. *Paracentrobia subflava*. Fêmea: vista lateral (A); vista ventral em preparação em lâmina (B); vista dorsal (C); detalhes da antena (D); asa anterior (E) e asa posterior (F).

Fotos: Ranyse Barbosa Querino







Figura 3. *Paracentrobia subflava*. Macho: vista dorsal (A); vista lateral (B); asa anterior (C); antena (D); mesophragma (E) e cápsula genital (F e G).

Fotos: Ranyse Barbosa Querino

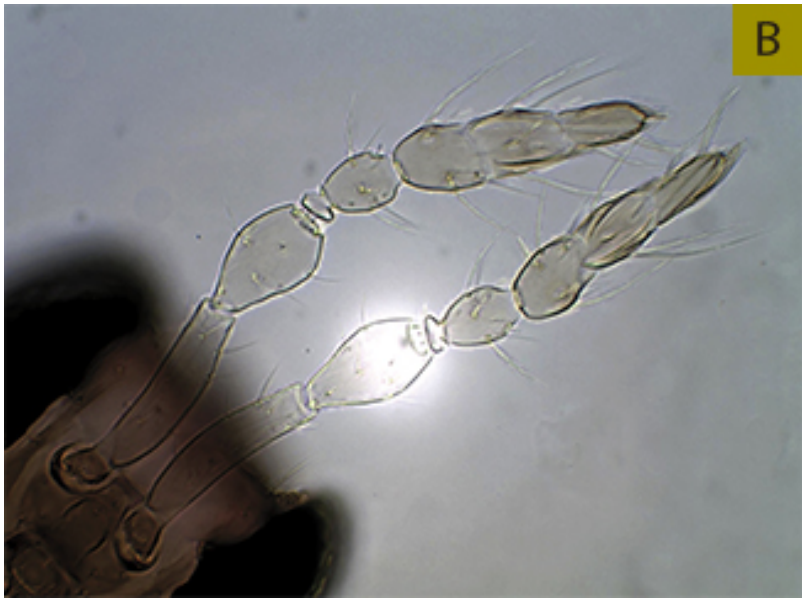
Diagnose – cor geral amarelo-limão pálida; pedicelo e segmento basal da clava antenal nitidamente mais escura; aspectos laterais do mesosoma com marcas escuras; pernas mais pálidas; asa anterior hialina, com uma mancha fosca subestigmal visível, que é cerca de três vezes o tamanho do estigma e de forma oval, moderadamente estreita e pubescente; ovipositor não exposto.

- Comentários - *P. subflava* é muito próxima a *P. tapajosae*, mas pode ser separada desta última principalmente pelas cerdas no disco na asa anterior, que é menos densa entre as áreas delimitadas pelas fileiras; em *P. tapajosae*, estas áreas são relativamente mais densas (VIRLA et al., 2009b).

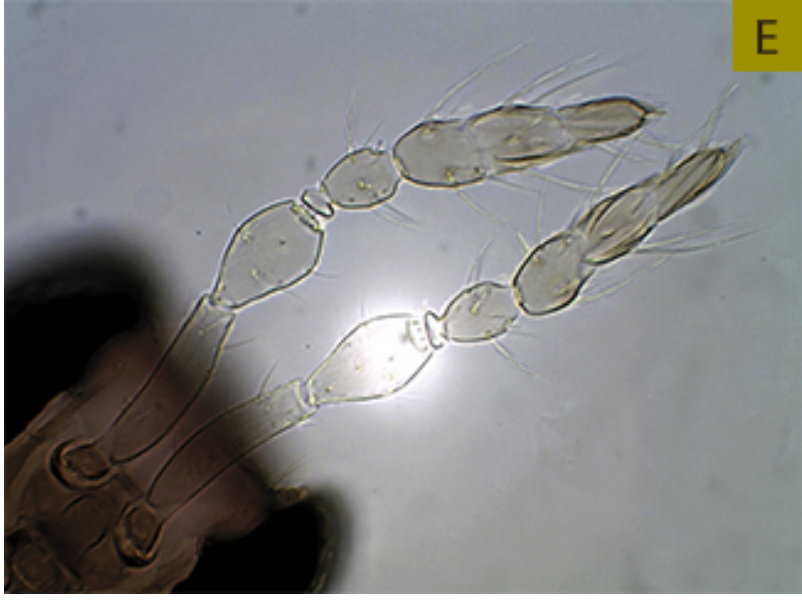
- Distribuição no Brasil – Paraná, Piauí, Rio de Janeiro.
- Hospedeiro – *Circulifer tenellus* (Baker), *D. maidis*, *Deltocephalus minutus* Van Duzee, *Empoasca solana* DeLong, *Empoasca* sp., *Graminella sonor* (Ball), (Cicadellidae); *Blissus leucopterus* (Say) (Lygaeidae); e *Halticus bractatus* (Say) (Miridae)(NOYES, 2015).

Pseudoligosita longifragiata (VIGGIANI, 1981)

(Trichogrammatidae: Oligositinae: Oligositini)] (Figura 4).







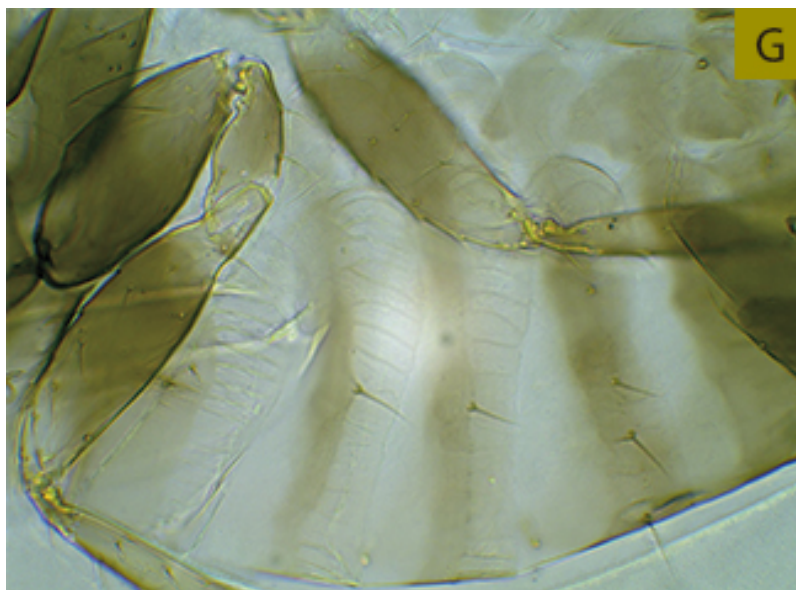


Figura 4. *Pseudoligosita longifrangjata*. Fêmea: vista lateral (A); antena (B); asa anterior (C). Macho: vista lateral (D); antena (E); asa anterior (F); e detalhes do abdome (G).

Fotos: Ranyse Barbosa Querino

- Diagnose – corpo marrom-amarelado, exceto, metanoto, propódeo, os lados da mesosoma, e metafemur mais escuro, com várias listras mais escuras no gaster; antena com segmento clava distal sem sensillum em forma de “coxa de galinha” (*drumstick*); clava quase tão longa quanto os comprimentos combinados de pedicelo, anelos e segmento funicular; asa anterior com fileiras de cerdas no disco, e as cerdas marginais, pelo menos, iguais à largura máxima de asa anterior; ovipositor não exposto (VIGGIANI, 1981).
- Distribuição no Brasil – Amazonas, Piauí.
- Hospedeiros – *Argia insipida* Hagen (Odonata: Coenagrionidae), *Dalbulus maidis* (Cicadellidae).
Os parasitoides de ovos de *D. maidis* mostram um comportamento generalista em atacar ovos de diferentes espécies hospedeiras. No entanto, esses parasitoides têm uma preferência

mais forte para Hemiptera: por exemplo, todos os registros de hospedeiros conhecidos de *A. breviphragma* e *P. subflava* pertencem a essa ordem de insetos. *Pseudoligosita longifrangata*, no entanto, também é conhecida por parasitar ovos da libélula *A. insipida*, em riachos.

Ocorrência e parasitismo de *D. maidis* durante duas épocas de cultivo de milho no Nordeste do Brasil

No Nordeste do Brasil, o percentual médio de parasitismo de ovos de *D. maidis* em milho foi muito baixo (0,8%). Os parasitoides de ovos ocorreram durante a estação chuvosa, no verão. Durante a estação seca, mesmo com o cultivo sob irrigação, a ocorrência de parasitoides diminuiu em maio de 2013 e aumentou novamente apenas em fevereiro 2014 (MENESES, 2015).

A porcentagem de parasitismo foi muito baixa durante todo o período de amostragem em Teresina, PI, e durante os cinco meses mais secos não ocorreu parasitismo. Os resultados deste estudo são semelhantes ao de Moya-Raygoza et al. (2014), que mostrou baixo parasitismo em *D. maidis* durante as duas safras de verão em cultivo sazonal de milho, no México, onde os parasitoides são expostos a condições ambientais mais variáveis. A média de ovos parasitados é variável dependente das condições bióticas e abióticas. Na Argentina e no México, onde a porcentagem de parasitismo de ovos desse mesmo hospedeiro é muito maior, observou-se que as taxas de parasitismo dependem dos locais de amostragem: por exemplo, o percentual médio de ovos parasitados de *D. maidis* em El Grullo e Zapopan (Jalisco, México) foi de 60,9% e 22,6%, respectivamente, enquanto em Los

Nogales e El Mollar (Tucumán, Argentina) foi de 44,8% e 3,4%, respectivamente (MOYA-RAYGOZA et al., 2012).

A baixa taxa de parasitismo dos ovos da cigarrinha-do-milho, no Nordeste do Brasil, pode estar relacionada com as altas temperaturas e baixa precipitação que ocorrem em Teresina, PI, durante a estação seca (Figura 5). Meneses (2015) encontrou uma correlação positiva entre a precipitação e o número total de parasitoides coletados. Em geral, com o aumento da precipitação, há um aumento no número de parasitoides que podem ser encontrados em campos de milho.

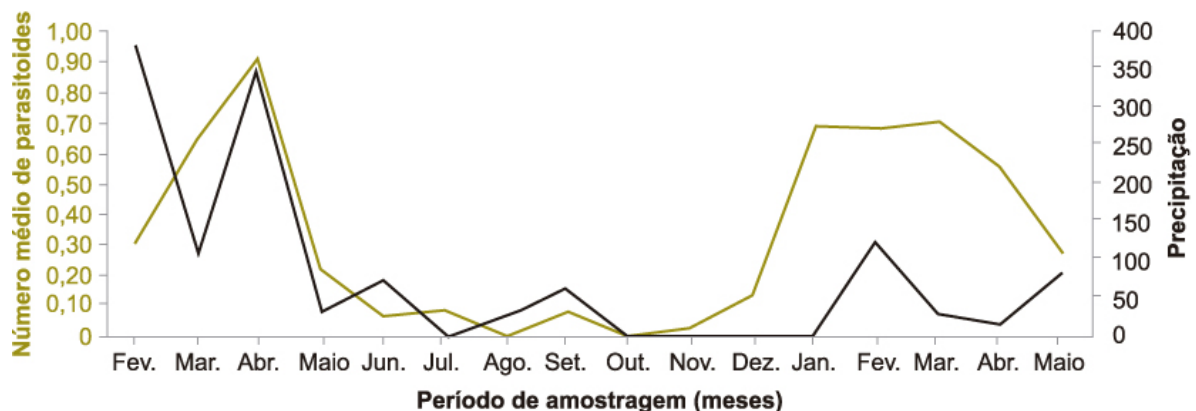


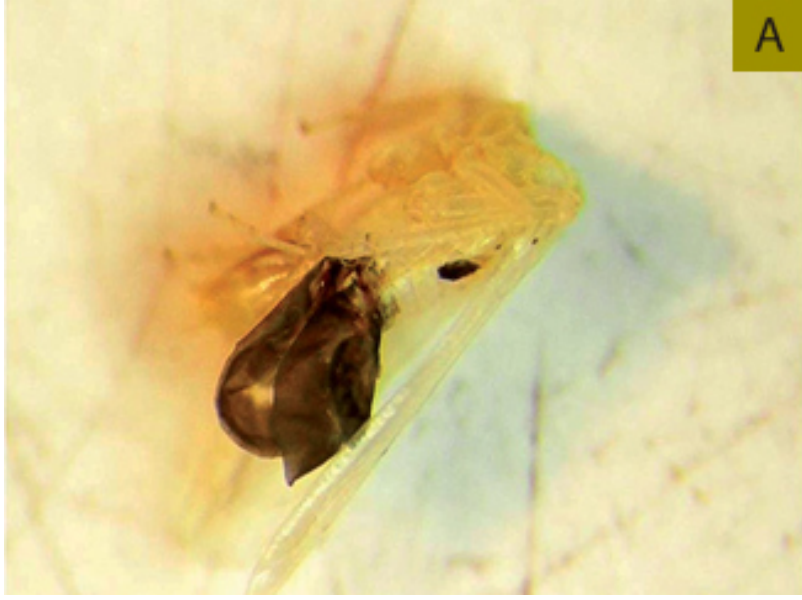
Figura 5. Número médio de parasitoides e pluviosidade durante o período de amostragem (estações seca e chuva) em Teresina, Piauí, Brasil.

P. subflava foi a espécie que ocorreu nos dois anos de amostragem durante a estação chuvosa, quando as condições climáticas eram mais favoráveis para os parasitoides. Por outro lado, durante a estação seca, as condições climáticas são muito drásticas, e não ocorreu o parasitismo de ovos de *D. maidis*.

Parasitoides de adultos de *D. maidis* no Nordeste do Brasil

Em 2012, foram coletados 42 adultos de *D. maidis*, e, entre estes, 10 espécimes desenvolveram sacos de parasitoides nos abdomens de seus hospedeiros (Figura 6A), principal sinal da presença de parasitismo por larvas de Dryinidae (Hymenoptera) (VIRLA et al., 2011).

Dos dez adultos de *D. maidis* que foram parasitados, oito eram fêmeas e dois machos; estes últimos morreram antes de o parasitoide ter completado o seu desenvolvimento, enquanto, de duas fêmeas da cigarrinha, as larvas do parasitoide emergiram dos sacos (em média sete dias após a coleta das amostras) e, em seguida, puparam (Figuras 6B e 6C). Parasitoides adultos emergiram oito dias após a pupação.



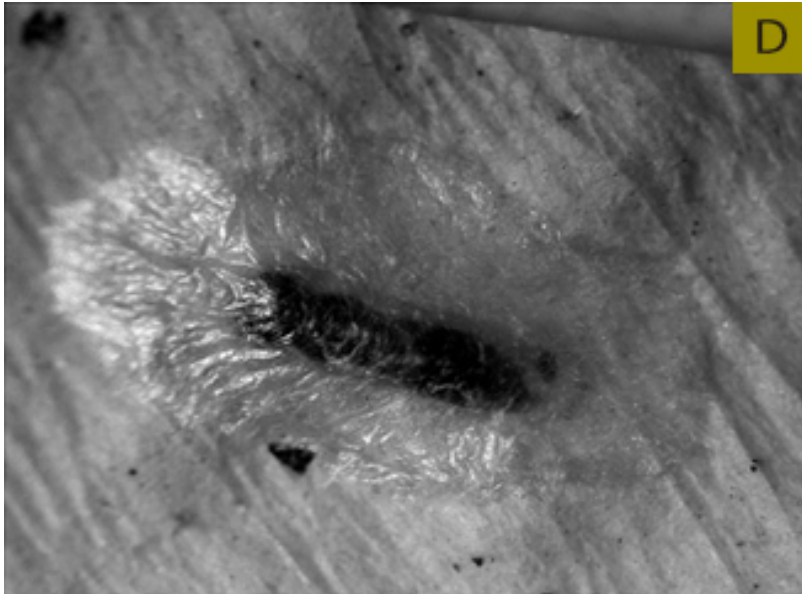




Figura 6. Saco larval do parasitoide (A); saco larval do parasitoide em desenvolvimento (B); *Gonatopus flavipes*, vista lateral (C); pupa do parasitoide (D); *Gonatopus flavipes*, vista dorsal (E).

Fotos: Ranise Barbosa Querino

Fêmeas adultas do parasitoide foram identificadas como *Gonatopus flavipes* (Figuras 6D e 6E). Esta espécie de Dryinidae também foi identificada parasitando *D. Elimatus*, em associação com teosinto (*Zea perennis*), no México (MOYA-RAYGOZA; TRUJILLO-ARRIAGA, 1993a, 1993b), e também atacando *Planicephalus flavicosta* (Stål), na Argentina, em associação com o capim *Digitaria sanguinalis* (VIRLA; PARADELL, 2002).

Referências

BARTLETT, K. A. A dryinid parasite attacking *Baldulus maidis* in Puerto Rico. **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 22, p. 497-498, 1939.

CHIAPPINI, E.; SORESSI, L.; FOGHER, C.; ZANIRATO, M. Genetic identity and relationship between four *Anagrus* species (Hymenoptera: Mymaridae) using RAPD

analysis. **European Journal of Entomology**, v. 96, n. 4, p. 393-400, 1999.

CLAUSEN, C. P. **Entomophagous insects**. New York: McGraw-Hill, 1940. 688 p.

GLADSTONE, S. M.; LLANA A. L.; RIOS, R.; LOPEZ, L. Egg parasitoids of the corn-leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) in Nicaraguan maize. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 96, p. 143-146, 1994.

GUGLIELMINO, A. Dryinidae (Hymenoptera Chrysidoidea): an interesting group among the natural enemies of the Auchenorrhyncha (Hemiptera). **Biologiezentrum Linz**, n. 176, p. 549-556, 2002. Disponível em: <http://www.zobodat.at/pdf/DENISIA_0004_0549-0556.pdf>. Acesso em: 13 out. 2015.

GUGLIELMINO, A.; BÜCKLE, C.; MOYA-RAYGOZA, G. Description of the larval instars of *Gonatopus bartletti* Olmi 1984 (Hymenoptera: Dryinidae). **Zootaxa**, n. 1226, p. 51-60, 2006.

GUGLIELMINO, A.; OLMÍ, M. A host-parasite catalog of world Dryinidae (Hymenoptera: Chrysidoidea). **Contributions on Entomology, International**, v. 2, n. 2, p. 165-298, 1997.

GUGLIELMINO, A.; OLMÍ, M.; BUCKLE, C. An updated host-parasite catalogue of world Dryinidae (Hymenoptera: Chrysidoidea). **Zootaxa**, v. 3740, n. 1, p. 1-113, 2013.

HUBER, J. T. Familia Mymaridae. In: FERNÁNDEZ F.; SHARKEY, M. J. (Ed.). **Introducción a los Hymenoptera de la región Neotropical**. Bogotá: Sociedad Colombiana de Entomología: Universidad de Colombia, 2006. p. 765-767.

HUBER, J. T. Mymaridae. In: GIBSON, G. A. P.; HUBER, J. T.; WOOLLEY, J. B. (Ed.). **Annotated keys to genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)**. Ottawa: NRC Research Press, 1997. p. 499-530.

KATHIRITHAMBY, J. Host-parasitoid associations in Strepsiptera. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 227-249, 2009.

KATHIRITHAMBY, J. Strepsiptera (Insecta) of Mexico: a review. **Vedalia**, v. 12, n. 2, p. 103-118, 2005.

KATHIRITHAMBY, J.; MOYA-RAYGOZA, G. *Halictophagus naulti* sp. n. (Strepsiptera: Halictophagidae), a new species parasitic in the corn-leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) from Mexico. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 93, n. 5, p. 1039-1044, 2000.

LUFT ALBARRACIN, E.; TRIAPITSYN, S. V. *Aprostocetus (Ootetrastichus) infulatus* (Hymenoptera: Eulophidae): description of the male, new distribution and first host records. **Zootaxa**, n. 1438, p. 65-68, 2007.

LUFT ALBARRACIN, E.; TRIAPITSYN, S. V.; VIRLA, E. G. Egg parasitoid complex of the corn-leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), in northwestern Argentina. **Revista Colombiana de Entomología**, [2016].

LUFT ALBARRACIN, E.; VIRLA, E. G.; TRIAPITSYN, S. V. A new host record for the egg parasitoid *Anagrus nigriventris* (Hymenoptera: Mymaridae) of the corn-leafhopper, *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). **Florida Entomologist**, v. 89, p. 284-285, 2006.

LUFT ALBARRACIN, E.; VIRLA, E.; TRIAPITSYN, S. Diversidad e incidencia de los parasitoides oófilos del vector del achaparramiento (CSS), *Dalbulus maidis* (Hemiptera, Cicadellidae), en Tucumán, Argentina. In: CONGRESO NACIONAL DE MAÍZ, 8., 2005, Rosario, Argentina. **Trabajos presentados y resumen de conferencias**. Buenos Aires: AIANBA, 2005. p. 258-261.

MARÍN, R. Biología y comportamiento de *Dalbulus maidis* (Homoptera-Cicadellidae). **Revista Peruana de Entomología**, v. 30, p. 113-117, 1987.

MENESES, A. R. **Dinâmica populacional de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) e seus parasitoides em cultivos de milho no nordeste brasileiro**. 2015. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí, Teresina.

MOYA-RAYGOZA, G. Diversity of leafhoppers and their hymenopteran parasitoids in maize, teosinte and gamagrass. In: AUCHENORRHYNCHA CONGRESS, 8., 1993, Delphi. **Proceedings...** Delphi: [s.n], 1993. p. 67-68.

MOYA-RAYGOZA, G. Diversity of leafhoppers and their hymenopterous parasitoids in maize, teosinte and gamagrass related ecosystems. **Maydica**, v. 39, p. 225-230, 1994.

MOYA-RAYGOZA, G. Native parasitoids of *Dalbulus elimatus* and *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) in winter crops of central Mexico. **Canadian Entomologist**, v. 139, p. 722-727, 2007.

MOYA-RAYGOZA, G. **Parasitoides de *Dalbulus* spp. (Homoptera: Cicadellidae) en Jalisco, México**. 1990. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, DF.

MOYA-RAYGOZA, G.; KATHIRITHAMBY, J.; LARSEN, K. J. Dry season parasitoids of adult corn-leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) on irrigated maize in Mexico. **Canadian Entomologist**, v. 136, p. 119-127, 2004.

MOYA-RAYGOZA, G.; LUFT ALBARRACIN, E.; VIRLA, E. G. Diversity of egg parasitoids attacking *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) populations at low and high elevation sites in Mexico and Argentina. **Florida Entomologist**, v. 95, p. 105-112, 2012.

MOYA-RAYGOZA, G.; RENTERIA, I. C.; LUFT ALBARRACIN, E.; VIRLA, E. G. Egg parasitoids of the leafhoppers *Dalbulus maidis* and *Dalbulus elimatus* (Hemiptera: Cicadellidae) in two maize habitats. **Florida Entomologist**, v. 97, n. 1, p. 309-312, 2014.

MOYA-RAYGOZA, G.; TRIAPITSYN, S.V. Egg parasitoids (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) of *Dalbulus quinquenotatus* (Hemiptera: Cicadellidae), with description of a new species of *Anagrus* (Mymaridae) from Mexico. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 108, n. 3, p. 289-298, 2015.

MOYA-RAYGOZA, G.; TRUJILLO-ARRIAGA, J. Dryinid (Hym.: Dryinidae) parasitoids of *Dalbulus* leafhopper (Hom.: Cicadellidae) in Mexico. **Entomophaga**, v. 38, n. 1, p. 41-49, 1993a.

MOYA-RAYGOZA, G.; TRUJILLO-ARRIAGA, J. Evolutionary relationships between *Dalbulus* leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) and its dryinid (Hymenoptera: Dryinidae) parasitoids. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 66, n. 1, p. 41-50, 1993b.

NAULT, L. R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica**, v. 35, p. 165-175, 1990.

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

NIELSON, M. W. **The leafhopper vectors of phytopathogenic viruses (Homoptera, Cicadellidae) taxonomy, biology, and virus transmission**. Washington, DC: USDA, 1968. 386 p. (USDA. Technical bulletin, 1382).

NOYES, J. S. **Universal Chalcidoidea Database**. 2015. Disponível em: <<http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids>>. Acesso em: 17 set. 2015.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S. Parasitoides de ovos da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DELONG & Wolcott) (Hemiptera, Cicadellidae), em Piracicaba. **Revista de Agricultura**, v. 75, n. 2, p. 263-270, 2000.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; DIAS, C. T. S.; NAULT, L. R. Influence of latitude and elevation on polymorphism among populations of the corn-leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. **Environmental Entomology**, v. 33, p. 1192-1199, 2004.

OLIVEIRA, C. M.; MOLINA, R. M. S.; ALBRES, R. S.; LOPES, J. R. S. Disseminação de molícutes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 91-95, 2002.

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, W. E. Enfezamento pálido e enfezamento vermelho na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 45-47, 1998.

OLMI, M. A revision of the Dryinidae (Hymenoptera). **Memoirs of the American Entomological Institute**, v. 37, p. 1-1913, 1984.

OLMI, M. Supplement to the revision of the world Dryinidae (Hymenoptera Chrysidoidea). **Frustula entomologica**, v. 12, n. 25, p. 109-395, 1991.

OLMI, M.; VIRLA, E. G. Dryinidae of the Neotropical region (Hymenoptera: Chrysidoidea). **Zootaxa**, n. 3792, n. 1, p. 1-534, 2014.

OLMI, M.; VIRLA, E. G.; FERNÁNDEZ, F. C. Las avispa Dryinidae de la región neotropical (Hymenoptera: Chrysidoidea). **Biota Colombiana**, v. 1, n. 2, p. 141-163, 2000.

- PINTO, J. D. A review of the New World genera of Trichogrammatidae (Hymenoptera). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 15, n. 1, p. 38-163, 2006.
- PINTO, J. D. Trichogrammatidae. In: GIBSON, G. A. P.; HUBER, J. T.; WOOLLEY, J. B. (Ed.). **Annotated keys to genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)**. Ottawa: NRC Research Press, 1997. p. 726-752.
- POLASZEK, A.; LUFT ALBARRACIN, E. Two new *Encarsia* species (Hymenoptera: Aphelinidae) reared from eggs of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) in Argentina: an unusual new host association. **Journal of Natural History**, v. 45, n. 1/4, p. 55-64, 2011.
- QUERINO, R. B.; ZUCCHI, R. A.; PINTO, J. D. Systematics of the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) with a focus on the genera attacking Lepidoptera. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. New York: Springer, 2010. p. 191-218.
- RAFAEL, J. A. As especies neotropicais de *Metadorylas* Rafael (Diptera: Pipunculidae). **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi. Zoologia**, v. 6, n. 2, p. 127-164, 1990.
- RAFAEL, J. A.; SKEVINGTON J. H. Pipunculidae (big-headed flies). In: BROWN, B. V.; BORKENT, A.; CUMMING, J. M.; WOOD, D. M.; WOODLEY, N. E.; ZUMBADO, M. A. (Ed.). **Manual of Central American Diptera**. Ottawa: NRC Research Press, 2010. v. 2, p. 793-803.
- SCHAUFF, M. E.; LA SALLE J.; COOTE, L. D. Eulophidae. In: GIBSON, G. A. P.; HUBER, J. T.; WOOLLEY, J. B. (Ed.). **Annotated keys to genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)**. Ottawa: NRC Research Press, 1997. p. 327-430.
- TRIAPITSYN, S. V. A review of the species of *Anagrus* Haliday, 1833 (Hymenoptera Mymaridae) collected by A. A. Ogloblin in Argentina. **Russian Entomological Journal**, v. 8, n. 3, p. 213-222, 2000.
- TRIAPITSYN, S. V. Descriptive notes on a new and other little known species of *Anagrus* Haliday, 1833 (Hymenoptera: Mymaridae) from the New World tropics and subtropics. **Entomotropica**, v. 17, p. 213-223, 2002.
- TRIAPITSYN, S. V. The genus *Anagrus* (Hymenoptera: Mymaridae) in America south of the United States: a review. **Ceiba**, v. 38, n. 1, p. 1-12, 1997.
- TRIPLEHORN, B. W.; NAULT, L. R. Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the Macrostelini. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, n. 3, p. 291-315, 1985.
- VEGA, F. E. A search for the natural enemies of *Dalbulus* species in Mexico: the importance of in-situ conservation. **Bulletin of the Ecological Society of America**, v. 70, p. 2, p. 286-287, 1989a. Supplement. 74th Annual ESA Meeting, University of Toronto, Toronto.
- VEGA, F. E. A search for the natural enemies of the corn-leafhopper (*Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) and the Mexican corn-leafhopper (*Dalbulus elimatus* (Ball) in Mexico.

In: INTERNATIONAL VEDALIA SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL, 1989, Riverside, California. **A century of success: programs and abstracts.** Riverside: [s.n.], 1989b. p. 75.

VEGA, F. E. Cría de adultos de *Gonatopus bartletti* Olmi (Hymenoptera: Dryinidae) de "chicharritas de maíz" parasitadas (*Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) y *Dalbulus elimatus* (Ball) (Homoptera: Cicadellidae). In: CONGRESO NACIONAL DE ENTOMOLOGÍA, 24., 1989, Oaxtepec. **Resúmenes.** Oaxtepec: Sociedad Mexicana de Entomología, 1989c. p. 208-209.

VEGA, F. E.; BARBOSA, P. *Gonatopus bartletti* Olmi (Hymenoptera: Dryinidae) in México: a previously unreported parasitoid of the corn-leafhopper *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) and the Mexican corn-leafhopper *Dalbulus elimatus* (Ball) [Homoptera : Cicadellidae]. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 92, p. 461-464, 1990.

VEGA, F. E.; BARBOSA, P.; PANDURO, A. P. *Eudorylas* (*Metadorylas*) sp. (Diptera: Pipunculidae): a previously unreported parasitoid of *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) and *Dalbulus elimatus* (Ball) (Homoptera: Cicadellidae). **Canadian Entomologist**, v. 123, p. 241-242, 1991.

VIGGIANI, G. Nearctic and Neotropical species of *Oligosita* Walker (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri**, v. 38, p. 101-118, 1981.

VIRLA, E. G. Aportes acerca de la bionomía de *Paracentrobia* (*P.*) *subflava* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), parasitoide de hemipteros cicadeloideos argentinos. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 58, n. 3/4, p. 17-22, 1999.

VIRLA, E. G. **Estudio bionómico de parasitoides e hiperparasitoides de Homopteros Cicadeloideos Argentinos.** 1992. 263 f. Tese (Doutorado) - Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad de La Plata, Buenos Aires.

VIRLA, E. G. Notes on the biology of *Anagrus breviphragma* (Hymenoptera, Mymaridae), natural enemy of the corn-leafhopper *Dalbulus maidis* (Hemiptera, Cicadellidae) and others plant diseases vectors in South America. **Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas**, v. 27, p. 239-247, 2001.

VIRLA, E. G.; ESPINOSA, M. S.; MOYA-RAYGOZA, G. First host record for *Anteon pilicorne* (Ogloblin) (Hymenoptera: Dryinidae), a parasitoid of Cicadellidae, including the corn-leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 285-287, 2011.

VIRLA, E. G.; LUFT ALBARRACIN, E. L.; MOYA-RAYGOZA, G. Egg parasitoids of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) in Jalisco State, Mexico. **Florida Entomologist**, v. 92, n. 3, p. 508-510, 2009a.

VIRLA, E. G.; LUFT ALBARRACIN, E.; TRIAPITSYN, S. V.; VIGGIANI, G.; LOGARZO, G. A. Description and biological traits of a new species of *Paracentrobia* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), an egg parasitoid of the sharpshooter *Tapajosa rubromarginata*

(Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 44, p. 47-53, 2009b.

VIRLA, E. G.; MOYA-RAYGOZA, G.; LUFT ALBARRACIN, E. Egg parasitoids of the corn-leafhopper, *Dalbulus maidis*, in the southernmost area of its distribution range. **Journal of Insect Science**, v. 13, n. 10, p. 1-7, 2013.

VIRLA, E. G.; MOYA-RAYGOZA, G.; RAFAEL, J. A. First record of *Eudorylas schreiteri* (Shannon) (Diptera: Pipunculidae) as a parasitoid of the corn-leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina, with a table of pipunculid-host associations in the Neotropical region. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 152-154, 2009c.

VIRLA, E. G.; OLMÍ, M. Dryinidae (Hymenoptera: Chrysidoidea) parasitoids of the corn-leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Argentina, with description of the male of *Gonatopus moyaraygozai* Olmi. **Interciencia**, Caracas, v. 32, n. 12, p. 847-849, 2007.

VIRLA, E. G.; OLMÍ, M. The Dryinidae of Argentina (Hymenoptera-Chrysidoidea). **Acta Entomologica Chilena**, v. 22, p. 19-35, 1998.

VIRLA, E. G.; PARADELL, S. L. On the biology of *Planicephalus flavicosta*, with notes about its parasitoids in Northern Argentina (Hemiptera, Cicadellidae). Università degli Studi di Roma, La Sapienza, Roma, Italy, **Fragmenta Entomologica**, v. 34, n. 1, p. 171-187, 2002.

VIRLA, E. G.; RAFAEL, J. A. Datos bionómicos preliminares y descripción de la hembra de *Cephalops penepauculus* (Hardy) (Diptera: Pipunculidae) un parasitoide de Delphacidae (Homoptera: Auchenorrhyncha) en Argentina. **CIRPON, Revista de Investigación**, v. 10, p. 33-36, 1996.

WILSON, M. R.; TURNER, J. A. **Leafhopper, planthopper and psyllid vectors of plant diseases**. Cardiff: Amgueddfa Cymru-National Museum of Wales, 2010. Disponível em: <<http://naturalhistory.museumwales.ac.uk/Vectors>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

WOOLLEY, J. B. Aphelinidae. In: GIBSON, G. A. P.; HUBER, J. T.; WOOLLEY, J. B. (Ed.). **Annotated keys to genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)**. Ottawa: NRC Research Press, 1997. p. 134-146.

Capítulo 9

Aspectos taxonômicos, biológicos e ecológicos da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae)

Charles Martins Oliveira | Ranyse Barbosa Querino



Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais produzidos no mundo. No Brasil, é uma das commodities agrícolas de maior importância, sendo a segunda em volume de produção, atrás apenas da soja (CONAB, 2015).

Um dos fatores limitantes da produção de milho na América Latina, e também no Brasil, é a cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae). Seus danos diretos à cultura, pela sucção contínua de seiva, são quase sempre negligenciáveis (BUSHING; BURTON, 1974; WAQUIL, 1997). Contudo, *D. maidis* causa prejuízos econômicos à cultura do milho por ser vetor de três fitopatógenos importantes: o vírus da risca do milho (*Maize rayado fino virus* – MRFV), *Spiroplasma kunkelli* Whitcomb et al. (*Corn stunt spiroplasma* – CSS) e um fitoplasma (*Maize bushy stunt phytoplasma* – MBSP) (NAULT, 1980, 1990).

O conhecimento da biologia e da ecologia da interação do inseto-vetor e dos fitopatógenos é importante quando se pensa em estratégias de manejo desses vetores visando o controle das doenças por ele disseminadas. Aspectos taxonômicos de *D. maidis* e de suas congêneres são bem conhecidos (TRIPLEHORN; NAULT, 1985; NAULT; STYER, 1994). Da mesma forma, a biologia dessa espécie tem sido bem estudada (BARNES, 1954; DAVIS, 1966; MARÍN, 1987; WAQUIL et al., 1999; ZURITA et al., 2000).

Diferentemente, os aspectos ecológicos e comportamentais de *D. maidis* sempre despertaram interesse especial, principalmente aqueles relacionados à sua capacidade de sobreviver na entressafra do milho, já que *D. maidis* pode ser considerada uma especialista em milho. Hipóteses como migração local ou a grandes distâncias, diapausa, sobrevivência nos restos da cultura do milho e a utilização de plantas hospedeiras alternativas têm sido propostas, principalmente no México (BARNES, 1954; NAULT, 1990; LARSEN et al., 1992; TAYLOR et al., 1993). Recentemente, um estudo conduzido no Brasil contribuiu para a compreensão do comportamento e dos mecanismos que essa espécie utiliza para

sobreviver aos períodos de entressafra da cultura do milho (OLIVEIRA et al., 2013a).

Neste capítulo são abordados aspectos da taxonomia e da bioecologia da cigarrinha *D. maidis*, o principal vetor de fitopatógenos (mollicutes e vírus) na cultura do milho no Brasil.

Aspectos taxonômicos e características morfológicas

Oman descreveu o gênero *Baldulus* em 1934, tendo como espécie-tipo *B. montanus* Oman (OMAN, 1934). A espécie *Deltocephalus elimatus* Ball foi incluída neste gênero e, posteriormente, também a espécie *Cicadula maidis* DeLong & Wolcott (DORST, 1937). O gênero *Baldulus* foi dividido por DeLong (1950) em *Baldulus* e *Dalbulus*, com *Dalbulus elimatus* (anteriormente pertencente ao gênero *Deltocephalus*) como espécie-tipo de *Dalbulus*, sendo a cigarrinha-do-milho (anteriormente pertencente ao gênero *Cicadula*) também transferida para esse mesmo gênero, possuindo hoje como nome válido *Dalbulus maidis* (TRIPLEHORN; NAULT, 1985). A espécie *D. maidis* (Figura 1) pertence à ordem Hemiptera, família Cicadellidae, subfamília Deltocephalinae e tribo Macrostelini (TRIPLEHORN; NAULT, 1985).

O gênero *Dalbulus* é composto atualmente por 13 espécies (Figura 1), divididas em três grupos monofiléticos:

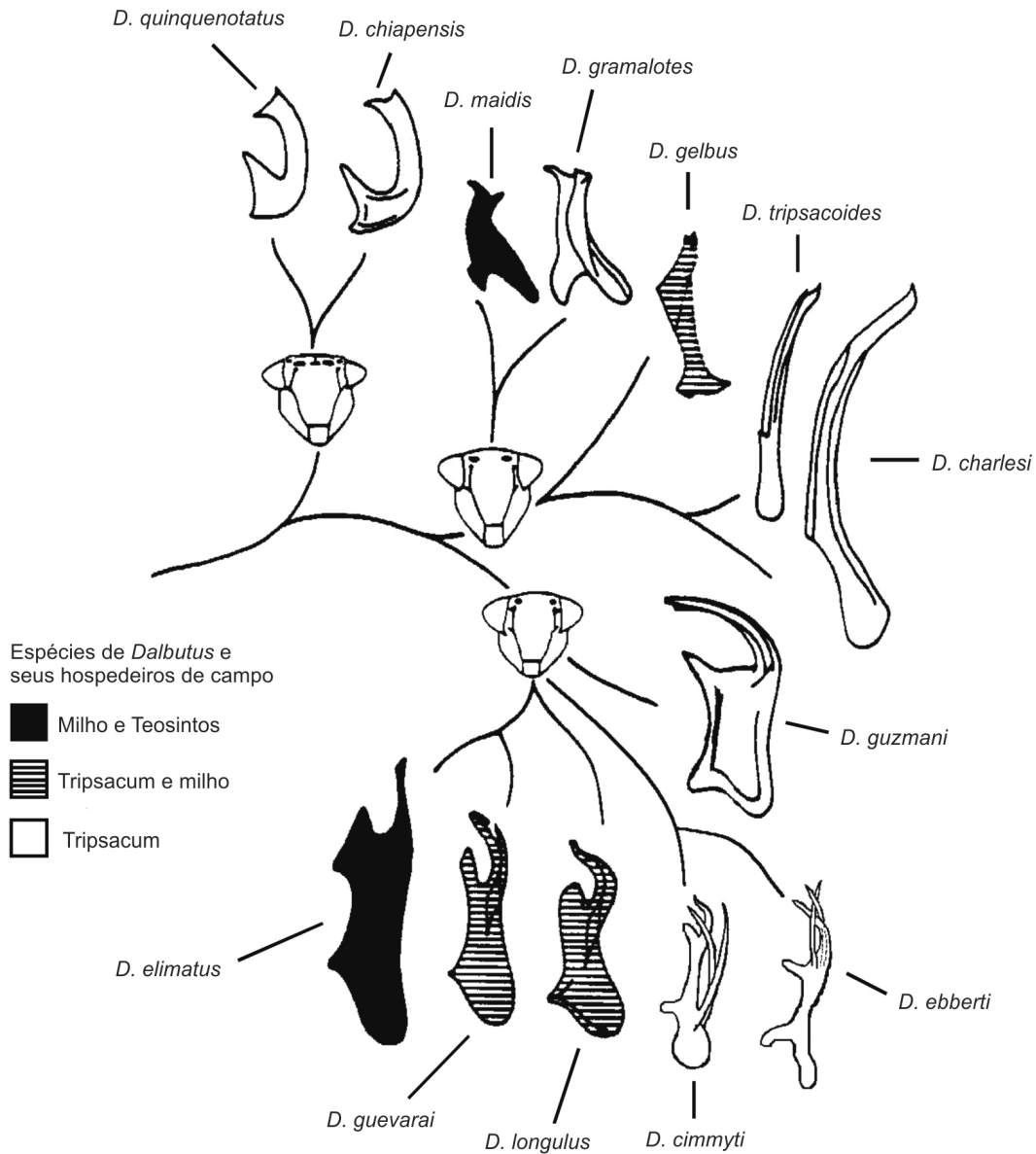


Figura 1. Cladograma morfológico mostrando a filogenia do gênero *Dalbulus* e seus três grupos monofiléticos. Vista frontal das cabeças de *D. quinquenotatus*, *D. maidis* e *D. elimatus* (acima, ao centro, abaixo) e vista lateral dos edeagos (pênis) das 13 espécies do gênero, com indicação de seus hospedeiros de campo conhecidos.

Fonte: adaptado de Triplehorn e Nault (1985), Nault (1990), Nault e Styer (1994).

- Grupo *quinquenotatus*: contém as espécies *D. quinquenotatus* DeLong & Nault e *D. chiapensis* Triplehorn & Nault. Especialistas em *Tripsacum* e consideradas morfológicamente as mais

primitivas do gênero, são encontradas no México e na Costa Rica (TRIPLEHORN; NAULT, 1985; NAULT, 1990).

- Grupo *maidis*: composto por *D. maidis* (DeLong & Wolcott), espécie que pode ser encontrada desde o sul dos EUA até as regiões temperadas da Argentina (OMAN, 1948; TRIPLEHORN; NAULT, 1985; NAULT, 1990; CARLONI et al., 2013). Especialista em milho (*Z. mays*), contudo, também pode ser encontrada em teosintos (*Zea* spp.), além de já ter sido coletada em *Tripsacum* spp. e em *Euchlaena mexicana* Schrad (BARNES, 1954; NAULT; DELONG, 1980; TSAI, 1988; NAULT, 1990). As outras espécies são: *D. gramalotes* Triplehorn & Nault, encontrada apenas na Colômbia em *T. dactyloides* (L.) (TRIPLEHORN; NAULT, 1985); *D. gelbus* DeLong, que ocorre no México e na Guatemala, em *Tripsacum* e em milho; *D. tripsacoides* DeLong & Nault e *D. charlesi* Triplehorn & Nault, encontradas no México em *Tripsacum* (TRIPLEHORN; NAULT, 1985; NAULT, 1990).
- Grupo *elimatus*: constituído por seis espécies. *Dalbulus elimatus* (Ball), ocorre no México. Especialista em milho, mas durante a entressafra da cultura pode se manter em hospedeiros alternativos, como plantas dos gêneros *Zea*, *Tripsacum* e *Bromus* L. (TRIPLEHORN; NAULT, 1985; NAULT, 1990). *Dalbulus guzmani* DeLong & Nault, *D. ebberti* Nault & Styer e *D. cimmyti* Nault & Styer ocorrem no México em *Tripsacum* (TRIPLEHORN; NAULT, 1985; NAULT; STYER, 1994). *Dalbulus guevarai* DeLong e *D. longulus* DeLong são encontradas em milho e *Tripsacum*, sendo que a primeira ocorre apenas no México e a última no México e na Guatemala (TRIPLEHORN; NAULT, 1985; NAULT, 1990).

Estudos realizados até o momento mostram que, das espécies pertencentes ao gênero *Dalbulus*, apenas *D. maidis* ocorre no Brasil. Em levantamentos realizados em 27 municípios brasileiros, pertencentes a dez estados e a quatro regiões da Federação, com latitudes entre 5°S e 28°S e elevações entre 16 m e 1.628 m, *D. maidis* foi a única espécie do gênero *Dalbulus* encontrada, e representou em média 74% dos cicadelídeos coletados no milho (OLIVEIRA et al., 2004). Em estudos realizados no Mato Grosso do Sul e em São Paulo, utilizando-se cartões adesivos amarelos, entre 1997 e 2000, foram coletados 14.435 espécimes do gênero *Dalbulus*, sendo todos esses espécimes pertencentes à espécie *D. maidis* (OLIVEIRA et al., 2013a).

Levando-se em consideração todos os estudos realizados até o momento com *D. maidis*, essa espécie já foi registrada em 143 municípios brasileiros em 17 estados (AL, BA, CE, MA, PA, PE, PI, RN, SE, MG, SP, RJ, GO, MS, PR, SC e RS) e no Distrito Federal (MENDES, 1938; COSTA, 1957; SILVA et al., 1968; COSTA et al., 1971; WAQUIL, 1997; OLIVEIRA et al., 1998, 2002a, 2003, 2004, 2007, 2013b; BASTOS et al., 2003; FRIZZAS et al., 2003; ÁVILA; ARCE, 2008; CRUZ et al., 2008; MARTINS et al., 2008; SILVA, 2008; SILVA et al., 2009; CAMBRUZZI et al., 2013; JUSTINIANO et al., 2014). Até o momento, *D. maidis* não foi relatada, apenas na região Norte do Brasil, muito provavelmente em função da carência de levantamentos nessa região.

Aspectos biológicos

A cigarrinha-do-milho é uma espécie tipicamente estrategista *r* (espécie que se adapta rapidamente a novos ambientes, apresenta curto tempo de geração, altas taxas de crescimento e corpo pequeno). Apresenta, entre as espécies de *Dalbulus*, o mais rápido período de desenvolvimento de ovo a adulto, a maior fecundidade, e é capaz de produzir, no mínimo, duas gerações durante o ciclo do milho, havendo um crescimento significativo da primeira para a segunda geração (NAULT; MADDEN, 1985; MADDEN et al., 1986; NAULT, 1990; TODD et al., 1991). Em cultivos de milho da primavera/verão realizados na região Sudeste do Brasil, entre setembro/outubro e abril/maio, estima-se que *D. maidis* possa produzir de cinco a seis gerações (WAQUIL et al., 1999).

Os dados disponíveis sobre a biologia de *D. maidis* apresentam grandes variações, dependendo de fatores como a temperatura, híbrido de milho, variações intrapopulacionais nas cigarrinhas, e metodologia de estudo utilizada (DAVIS, 1966; MARÍN, 1987; TSAI, 1988; WAQUIL et al., 1999; ZURITA et al., 2000).

Ovo

D. maidis apresenta período embrionário que pode variar de cinco a oito dias, em temperaturas entre 23 °C e 26 °C (DAVIS, 1966; MARÍN, 1987; WAQUIL et al., 1999).

Os ovos de *D. maidis* apresentam coloração branca, córion transparente, e medem cerca de 1,3 mm. A região do opérculo é mais delgada que o extremo posterior (MARÍN, 1987). As fêmeas inserem individualmente os ovos nos tecidos das plantas sob a camada epidérmica do limbo foliar, ou na nervura central da folha, em posição horizontal, e esses ovos inseridos formam linhas

paralelas às nervuras da folha. Os ovos podem ser depositados isoladamente, em pares, ou em grupos de cinco ou seis (HEADY; NAULT, 1984; HEADY et al., 1985; MARÍN, 1987).

Ninfas

A cigarrinha *D. maidis* apresenta cinco instares. A duração dos estádios ninfais é fortemente influenciada pela temperatura ou pelo genótipo do milho utilizado. Em estudos realizados em temperatura de aproximadamente 23 °C os estádios ninfais tiveram duração total de 12,5 dias com 2, 2, 2, 3 e 3 dias para cada um dos cinco instares, respectivamente (MARÍN, 1987). Em estudos realizados no Brasil com seis híbridos de milho, em temperatura de cerca de 26 °C, a duração do período ninfal variou de 24,5 a 27,1 dias (ZURITA et al., 2000). Em temperaturas de 10 °C, o estágio ninfal leva cerca de 115 dias para se completar; por outro lado, em temperaturas próximas de 26 °C a 27 °C, esse período é de aproximadamente 14 a 16 dias (TSAI, 1988; WAQUIL et al., 1999).

Características morfológicas das ninfas

Os caracteres principais para descrição de ninfas de *D. maidis* são aqueles baseados na coloração e na quetotaxia ninfal (BARNES, 1954).

Ninfa de primeiro instar: mede aproximadamente 1,0 mm. Cabeça triangular com os olhos compostos ovais, que apresentam coloração roxo-escura no extremo posterior. Antenas inseridas abaixo dos olhos, com os dois primeiros segmentos curtos e grossos. Flagelo setiforme e segmentado. Protórax mais desenvolvido do que o meso

e metatórax, que são aproximadamente do mesmo tamanho. Pernas largas e de coloração marrom-amarelada. Abdome oval e alargado apicalmente (MARÍN, 1987). Apresenta um par de cerdas sobre a margem dorsal posterior do metatórax, seis cerdas na submargem posterior do oitavo tergito abdominal, e quatro cerdas na ponta do abdome (BARNES, 1954) (Figura 2A).

Ninfa de segundo instar: apresenta coloração branco-leitosa, mede cerca de 1,5 mm, sendo semelhante à ninfa de primeiro instar, porém o mesotórax é emarginado, e as pernas são mais desenvolvidas (MARÍN, 1987). A distribuição das cerdas no tórax é semelhante à distribuição que se observa em ninfas de primeiro-estádio, porém apresenta um par de cerdas na submargem dos tergitos abdominais de III a VIII, em fileiras longitudinais (BARNES, 1954) (Figura 2B).

Ninfa de terceiro instar: coloração amarelo-leitosa. Mede aproximadamente 2,0 mm de comprimento. Apresenta tecas alares e meso e metatórax claramente desenvolvidos (MARÍN, 1987). Quetotaxia do tórax e abdome semelhante a das ninfas do segundo estágio (BARNES, 1954) (Figura 2C).

Ninfa de quarto instar: mede aproximadamente 2,5 mm. Exibe coloração amarelo-leitosa, apresenta tecas alares bem desenvolvidas, alcançando o primeiro segmento abdominal (MARÍN, 1987). Apresenta um par de manchas bem definidas no oitavo tergito. Quetotaxia do abdome como no terceiro estágio, porém sem o par de cerdas do tórax (BARNES, 1954) (Figura 2D).

Ninfa de quinto instar: apresenta coloração amarela e mede aproximadamente 3 mm. Os olhos são de coloração verde-amarelada, o meso e metatórax são bem desenvolvidos e as tecas

alares alcançam o segundo segmento abdominal (MARÍN, 1987).
Distribuição de cerdas como nas ninfas de quarto estágio (BARNES,
1954) (Figura 2E).

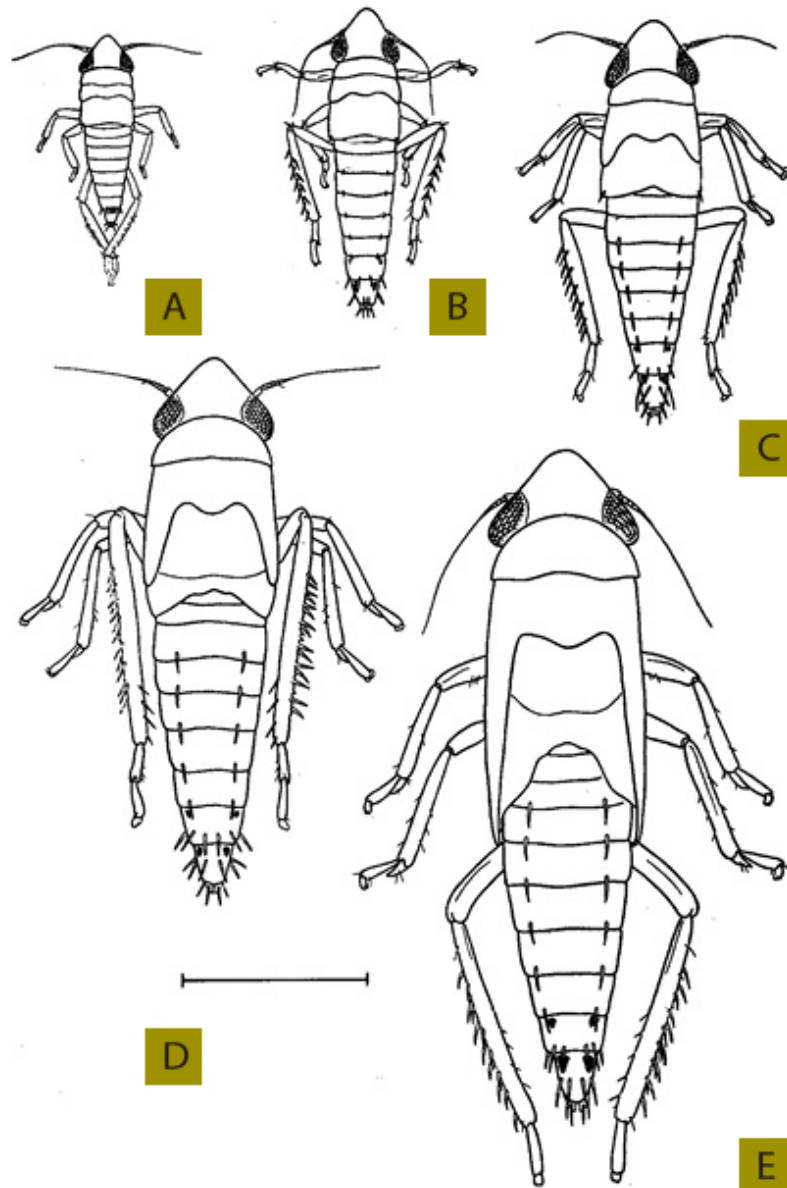


Figura 2. Estádios de desenvolvimento de *Dalbulus maidis* (linha = 1,0 mm). Primeiro instar (A); segundo instar (B); terceiro instar (C); quarto instar (D) e quinto instar (E).

Fonte: adaptado de Barnes (1954).

Adultos

São insetos diminutos, com cerca de 3,7 mm a 4,3 mm de comprimento. Apresentam coloração amarelo-palha, sendo as fêmeas maiores que os machos. Os adultos possuem duas manchas circulares negras bem marcadas na coroa, o que permite diferenciá-los de outras cigarrinhas comumente encontradas na cultura do milho (Figura 3) (TRIPLEHORN; NAULT, 1985; MARÍN, 1987; OLIVEIRA, 1996). Localizam-se nos ponteiros, principalmente no interior do cartucho das plantas, e são mais ativos que as ninfas (MARÍN, 1987). A identificação exata da espécie só é possível por meio da observação da genitália masculina, auxiliada pela forma do sétimo esternito da fêmea (Figura 4) (BARNES, 1954; TRIPLEHORN; NAULT, 1985).



Figura 3. Adulto da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis*.

Foto: Charles Martins de Oliveira

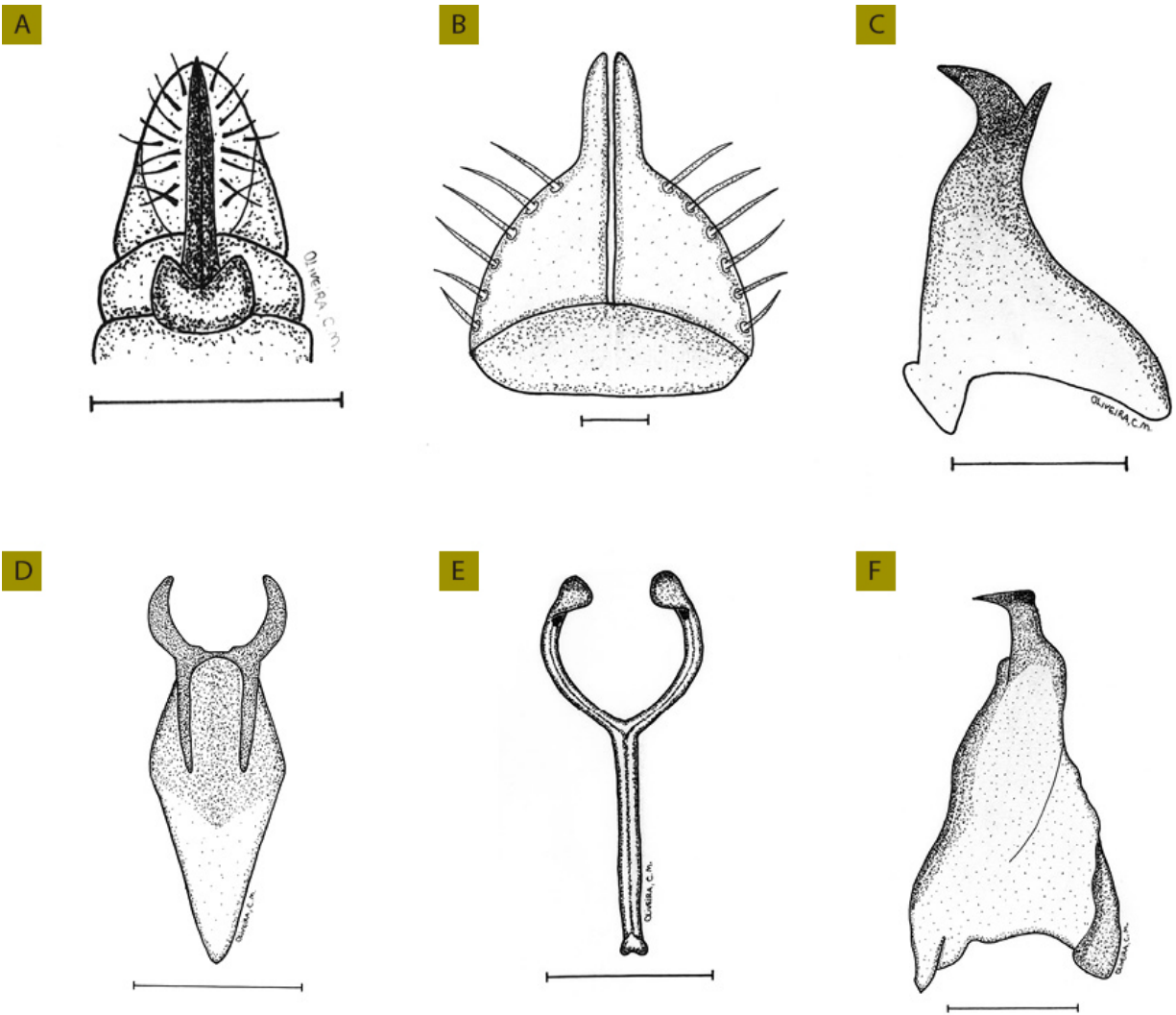


Figura 4. Caracteres utilizados na identificação taxonômica da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis*. Fêmea: ovipositor em vista ventral mostrando sétimo esternito abdominal (A). Genitália masculina: placa genital em vista ventral (B); edeago em vista lateral e dorsal (C e D); conectivo em vista dorsal (E); estilo em vista dorsal (F). Linhas: 1,0 mm (A) e 0,1 mm (B–F).

Ilustração: Charles Martins de Oliveira

A longevidade dos adultos é muito variável dentro de uma mesma população de cigarrinhas (WAQUIL et al., 1999). Em estudos de laboratório, a longevidade média de adultos, mantidos entre 26 °C e 27 °C, pode variar de 51,4 a 77,5 dias (TSAI, 1988; WAQUIL et al., 1999). Nas populações estudadas por Waquil et al. (1999), e

mantidas a 26 °C, observaram--se indivíduos que viveram menos de 20 dias e outros cuja longevidade foi superior a 110 dias.

Longevidades menores foram registradas por Marín (1987), sendo de 16,3 dias para machos e de 42,1 dias para fêmeas, em temperatura de cerca de 23 °C.

Dalbulus maidis apresenta um período de pré-oviposição de 8,5 dias e o período de oviposição é de 29,6 dias (MARÍN, 1987). A fecundidade pode variar de 128,7 a 611,1 ovos por fêmea, em temperatura de cerca de 23 °C (MARÍN, 1987) e 27 °C (TSAI, 1988), respectivamente. Machos e fêmeas têm maior longevidade em temperaturas mais baixas (≈ 15 °C) e menor em temperaturas mais elevadas (≈ 32 °C). Fêmeas virgens têm longevidade de 1,6 (≈ 15 °C) a 2,7 (≈ 32 °C) vezes maior que fêmeas fecundadas (TSAI, 1988).

Aspectos ecológicos

Dentre os componentes do ciclo de vida de *D. maidis*, aqueles relacionados à sua ecologia e comportamento têm papel fundamental para a compreensão da interação vetor-fitopatógeno e planta hospedeira, e parecem ser a chave para o desenvolvimento de estratégias eficientes para o manejo das doenças do milho que são causadas por patógenos transmitidos por essa cigarrinha. Conhecer a dinâmica populacional do vetor em diferentes regiões do país e compreender como os fitopatógenos (mollicutes e vírus) e o seu vetor, a cigarrinha-do-milho, sobrevivem durante os períodos em que o milho não é plantado (entressafra) podem ser essenciais para o sucesso das medidas de controle a serem adotadas.

Dinâmica populacional

D. maidis é uma espécie que não apresenta diapausa, ao contrário de outras espécies congêneres, como *D. quinquenotatus* e *D. chiapensis*, que se alimentam de *Tripsacum*, e provavelmente apresentam diapausa (ovos ou adultos) durante a ausência da planta hospedeira (NAULT, 1990). Assim, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde as temperaturas médias são mais elevadas, *D. maidis* pode se desenvolver continuamente durante o todo o ano, dependendo exclusivamente da disponibilidade de alimento.

Estudos da dinâmica populacional da cigarrinha-do-milho no Brasil já foram conduzidos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, e têm demonstrado que, de maneira geral, *D. maidis* pode ser coletada continuamente durante todo o ano (WAQUIL, 1997; ÁVILA; ARCE, 2008; OLIVEIRA et al., 2013a, 2015; MENESES, 2015).

Em estudos realizados na região Sudeste (Sete Lagoas, MG), com amostragens contínuas durante todo o ano, observou-se que *D. maidis* apresenta um pico populacional entre fevereiro e abril (WAQUIL et al., 1999). Outro estudo, também em Sete Lagoas, MG, mostrou que em cultivos de milho realizados a partir de fevereiro e abril (milho safrinha) são coletadas mais cigarrinhas do que nos cultivos de outubro e novembro (safra de verão) (OLIVEIRA et al., 2015). No Estado de São Paulo (Piracicaba, SP), em área com plantio contínuo de milho, embora as maiores populações de *D. maidis* tenham sido registradas nos meses de novembro e dezembro, outro pico populacional ocorreu entre fevereiro e maio (OLIVEIRA et al., 2013a).

Na região Centro-Oeste, em áreas com plantios de milho no verão (novembro a fevereiro) e safrinha (fevereiro a julho), as maiores abundâncias de *D. maidis* foram registradas em julho e agosto em Dourados, MS, e em julho e dezembro em Ponta Porã (ÁVILA; ARCE, 2008). Em Anastácio, MS, com plantios de milho apenas no verão, as maiores abundâncias da cigarrinha-do-milho foram observadas entre novembro e fevereiro, porém observaram-se picos de cigarrinhas entre março e agosto quando não havia milho no campo (OLIVEIRA et al., 2013a).

No Nordeste (Teresina, PI) em plantios realizados durante o período chuvoso (fevereiro) e durante a estação seca (julho) observou-se que o número médio de *D. maidis* coletadas por armadilha foi cerca de 14 vezes maior nos plantios realizados a partir de julho sob irrigação (MENESES, 2015).

Esses estudos sobre a dinâmica populacional de *D. maidis* sugerem que, de maneira geral, as populações da cigarrinha-do-milho podem ocorrer em milho em qualquer época do ano. Entretanto, independentemente da região do país, há um aumento populacional do inseto em cultivos tardios, sejam eles de milho safrinha, ou plantios de inverno sob irrigação. Esse fenômeno, provavelmente, ocorre em função de dois fatores.

Primeiro, durante o verão, as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento do inseto e permitem que, gradativamente, ao longo das gerações, que podem ser de cinco a seis no período de setembro/outubro e abril/maio (WAQUIL et al., 1999), a população da cigarrinha aumente de forma contínua. O segundo é o que Oliveira et al. (2015) chamaram de “efeito de concentração”. Esse fenômeno ocorre em função da colheita da safra de verão ou da senescência do milho no campo, forçando as populações de *D.*

maidis a abandonarem esses cultivos de milho senescentes e, por meio da migração (OLIVEIRA et al., 2013a), passem a buscar milho jovem (milho safrinha ou plantios de outono/inverno). Em muitos casos, como a disponibilidade de campos com plântulas de milho, a partir de fevereiro/março, é relativamente menor que os campos recém-colhidos da safra de verão e, como a população da cigarrinha aumenta consideravelmente no decorrer do verão, há uma concentração das populações de *D. maidis* nos plantios tardios.

Esse comportamento talvez seja uma das explicações para a ocorrência de surtos epidêmicos de enfezamentos que ocorrem no milho em algumas regiões do país, que geralmente são mais comuns no milho safrinha (OLIVEIRA et al., 2002b). Esses surtos podem ser função do efeito de concentração de cigarrinhas em milho tardio, condições ambientais favoráveis, e do fato de que as populações migrantes de *D. maidis* podem apresentar taxas de infetividade com mollicutes relativamente altas (OLIVEIRA et al., 2002a, 2015).

Estratégias de sobrevivência de *D. maidis* na entressafra do milho no Brasil

Para os insetos fitófagos (monófagos ou oligófagos) que utilizam plantas cultivadas anuais de ciclo relativamente curto, o período entre a colheita e o plantio de uma nova safra (entressafra) pode representar um sério obstáculo dentro de seu ciclo de vida. A entressafra, quando a(s) sua(s) fonte(s) de recursos para abrigo, alimentação e/ou reprodução estão indisponíveis, ou escassamente distribuídas, representa uma fase crítica para a sua sobrevivência.

De maneira geral, a sobrevivência das espécies de insetos durante a ausência de seu hospedeiro principal pode envolver basicamente três caminhos: diapausa (MASAKI, 1980; DENLINGER, 1986; LEATHER et al., 1993), utilização de hospedeiros alternativos (BARNES, 1954; NAULT, 1985) ou migração (RANKIN, 1985; DANTHANARAYANA, 1986; DRAKE; GATEHOUSE, 1995; GATEHOUSE, 1997). Entretanto, essas alternativas não são adotadas como estratégias únicas pelas espécies, podendo ser utilizadas de forma complementar.

Para a espécie *D. maidis* e, em consequência, para os dois mollicutes fitopatogénicos (*S. kunkelii* e MBSP) por ela transmitidos, o milho é o único hospedeiro conhecido no Brasil (OLIVEIRA et al., 2002a; OLIVEIRA; LOPES, 2004). Contudo pouco se sabe como essa cigarrinha e os fitopatógenos associados a ela sobrevivem à entressafra do milho. Estudos têm apontado a migração, a diapausa em restos da cultura do milho e/ou a existência de plantas hospedeiras alternativas como possíveis mecanismos para a sobrevivência dessa espécie na ausência do milho (LARSEN et al., 1992).

Recentemente, estudos ecológicos e estudos por meio de marcadores moleculares foram conduzidos no Brasil com o objetivo de compreender os mecanismos de sobrevivência de *D. maidis* em regiões onde ocorre a entressafra do milho (OLIVEIRA et al., 2013a). Neste estudo, populações de *D. maidis* foram monitoradas com cartões adesivos amarelos (0,5 m; 1,5 m e 2,5 m do solo) por 16 a 29 meses em Anastácio, MS, em duas fazendas com pastagens perenes (Pastagem 1 e Pastagem 2), onde o milho não havia sido cultivado por mais de cinco anos, e em uma fazenda de subsistência distante mais de 20 km (Milho 1). Em todas as áreas de

Anastácio, MS, exceto na área Pastagem 2, o milho foi anualmente semeado na primavera. A quarta área era localizada em Piracicaba, SP, onde o milho foi cultivado durante todo o ano (Milho 2). Na área Milho 2 também foram instaladas armadilhas adesivas em alturas maiores (7 m, 13 m e 16 m). Realizou-se também uma análise de RAPD-PCR em cigarrinhas coletadas no milho em duas áreas (Milho 1 e Pastagem 1) no início do cultivo do milho (15 a 20 dias após a emergência das plântulas) e ao final do cultivo (110 a 120 dias após a emergência das plantas) para se estudar a estrutura genética das populações de *D. maidis*.

Os dados de Oliveira et al. (2013a) mostraram que *D. maidis* pôde ser coletada nas quatro áreas experimentais, incluindo-se as áreas de pastagem (Pastagem 1 e 2) onde o milho nunca havia sido cultivado. Na área Pastagem 2, onde o milho não foi plantado durante o estudo e que permaneceu coberta com pastagem, houve coleta de *D. maidis* em julho e agosto. Nas outras áreas, a coleta de cigarrinhas foi contínua durante todo o ano. Em todas as áreas de Anastácio houve picos de coleta de *D. maidis* em julho e agosto, e sempre que o solo foi preparado para a semeadura do milho. O número de fêmeas de *D. maidis* foi maior que o número de machos logo após o plantio, no fim do ciclo do milho, e, principalmente, nos picos populacionais observados durante o preparo do solo. Nas coletas em maiores alturas, realizadas em Piracicaba, SP, observou-se que mais 75% das cigarrinhas foram coletadas a 16 m de altura e 69% dessas cigarrinhas eram fêmeas. As análises genéticas realizadas mostraram que as populações de *D. maidis* são muito similares.

Esses resultados são evidências de que a migração a longas distâncias é uma das estratégias de sobrevivência de *D. maidis* na

entressafra do milho. Por exemplo, o súbito aparecimento de adultos de *D. maidis* em áreas de pastagem onde o milho não era cultivado há muito tempo, e que se encontravam distantes de outras áreas com milho (> 20 km) e os picos de cigarrinhas coletadas em julho e agosto nas áreas de Anastácio, MS, quando não havia milho na região, sugerem que essas cigarrinhas tenham migrado após a colheita do milho safrinha de outras regiões do país e que, muitas vezes, ficam distantes centenas de quilômetros. Essa hipótese concorda com estudos de Larsen et al. (1992) e Taylor et al. (1993).

A captura de *D. maidis* em Piracicaba, SP em alturas de 7 m, 13 m e 16 m é uma evidência adicional do comportamento migratório dessa espécie. Capturas em alturas maiores, onde a velocidade do vento é maior do que a velocidade de voo (TAYLOR, 1974; TERAGUCHI, 1986), podem indicar que as cigarrinhas estavam sendo transportadas por correntes de vento. Os picos populacionais de coleta foram detectados nos meses de fevereiro e março, coincidindo com o fim da safra de milho de verão, indicando que essas cigarrinhas poderiam estar abandonando essas áreas de cultivo em voos migratórios. As alterações na razão sexual de *D. maidis*, observada para as cigarrinhas capturadas, também sugerem um comportamento migratório. Observou-se que as primeiras cigarrinhas que chegaram às áreas de milho, ou quando o solo foi preparado para a semeadura, eram fêmeas, provavelmente porque as fêmeas são responsáveis pela colonização inicial das novas áreas desse cereal. Da mesma forma, no final do ciclo do milho um grande número de fêmeas foi capturado, indicando que esses espécimes realizavam voos migratórios para colonizar novos cultivos de milho. Também se registrou, nas capturas acima de 7 m, em Piracicaba, SP, que 69% dos insetos eram fêmeas. Fêmeas são, geralmente, mais bem adaptadas do que os machos para sobreviver

em condições adversas como o período de entressafra, e são mais frequentemente coletadas em alturas maiores onde espécimes imigrantes predominam (TERAGUCHI, 1986; FLINN et al., 1990; LARSEN et al., 1992).

Os dados genéticos a respeito das populações de *D. maidis* obtidos por Oliveira et al. (2013a) mostraram que as populações de cigarrinhas são geneticamente muito similares, independentemente da área, fase do ciclo do cultivo de milho, ou do mês em que os insetos foram amostrados. Esses resultados reforçam a hipótese de uma estratégia migratória para *D. maidis*. A migração tende a aumentar o fluxo gênico entre as populações, contribuindo para a manutenção da variabilidade genética e falta de correlação entre a genética e a origem geográfica das populações (HOOLE et al., 1999).

Embora as evidências reunidas por Oliveira et al. (2013a) apontem para uma estratégia migratória por parte de *D. maidis* para sobreviver à entressafra do milho no Brasil, observou-se também nesse estudo que as plantas voluntárias de milho, ou seja, plantas que nascem espontaneamente nas áreas de cultivo, provenientes de sementes que caíram ao solo durante a colheita do milho, parecem ser importante na manutenção de populações de *D. maidis* durante a entressafra. Grande número de cigarrinhas foi coletado em algumas áreas de estudo, durante a entressafra do milho. Esse número elevado de *D. maidis* foi atribuído às cigarrinhas que permaneceram nessas áreas se alimentando das plantas voluntárias de milho (OLIVEIRA et al., 2013a). Em estudos realizados na Califórnia (EUA) também se observou que as plantas voluntárias de milho desempenham papel fundamental na sobrevivência de

populações de *D. maidis* durante períodos de ausência da planta hospedeira (SUMMERS et al., 2004).

D. maidis não foi coletada por meio de armadilhas colocadas em vegetação adjacente às áreas de estudo, e nem foi observada em inspeção visual, em amostras coletadas por meio de succionador motorizado ou rede entomológica, em árvores, arbustos ou gramíneas (principalmente *Brachiaria* spp. e *Andropogon* spp.) próximas aos experimentos. Assim não existem evidências de que essa espécie utilize hospedeiros alternativos em habitats adjacentes aos cultivos de milho na entressafra desse cereal, no Brasil, como proposto por Larsen et al. (1992), Summers et al. (2004) e Moya-Raygoza et al. (2007), na América do Norte e no México.

Diante do exposto, os estudos realizados no Brasil para investigar as estratégias de sobrevivência de *D. maidis* durante a entressafra do milho (OLIVEIRA et al., 2013a) indicam que essa espécie utiliza uma estratégia mista:

- Estratégia 1: onde o milho é cultivado sazonalmente, em áreas isoladas, a migração de longa distância parece ser um componente importante da bioecologia de *D. maidis*. As populações dessa cigarrinha abandonam os campos senescentes e, por meio de voos migratórios, buscam novas áreas de plantio.
- Estratégia 2: em áreas onde o milho é cultivado ao longo do ano, com a irrigação, ou onde as plantas de milho espontâneas estão disponíveis durante a entressafra, populações de *D. maidis* permanecem localmente na área e, provavelmente, representam a principal fonte de insetos para a colonização de novos campos de milho que serão plantados nessas áreas.

Considerações finais

O conhecimento das características biológicas e ecológicas de *D. maidis*, que foram apresentadas neste capítulo, permite a proposição de algumas estratégias para o manejo das doenças causadas pelos fitopatógenos transmitidos por essa cigarrinha.

As estratégias para o manejo dos fitopatógenos agentes causais dos enfezamentos em milho devem levar em consideração que sua disseminação pode ser promovida por populações de cigarrinhas que permanecem localmente, e também por adultos de *D. maidis* migrantes, provenientes de áreas distantes.

Em áreas onde o milho é cultivado sazonalmente, as estratégias devem envolver a eliminação de plantas voluntárias de milho durante a entressafra, para impedir a sobrevivência das populações locais *D. maidis*, e a aplicação de inseticidas nas fases iniciais do cultivo do milho, quando as plântulas são mais suscetíveis aos enfezamentos, para controlar cigarrinhas migrantes e impedir a disseminação dos mollicutes agentes causais dessas doenças.

Em áreas irrigadas, onde o milho é cultivado de forma contínua ao longo do ano, inseticidas também poderiam ser usados ao final de cada ciclo de cultivo, para reduzir as populações desse inseto-vetor e a pressão de inóculo dos fitopatógenos que transmite, sobre os cultivos de milho subsequentes.

Referências

ÁVILA, C. J.; ARCE, C. C. M. Flutuação populacional da cigarrinha-do-milho em duas localidades do Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1129-1132, 2008.

BARNES, D. **Biología, ecología, y distribución de las chicharritas, *Dalbulus elimatus* (Ball) y *Dalbulus maidis* (Del. & W.)**. Mexico, DF: Secretaria de Agricultura y Ganadería, Oficina de Estudios Especiales, 1954. 112 p. (Folleto técnico, 11).

BASTOS, C. S.; GALVÃO, J. C. C.; PIKANÇO, M. C.; CECON, P. R.; PEREIRA, P. R. G. Incidência de insetos fitófagos e de predadores no milho e no feijão cultivados em sistema exclusivo e consorciado 1. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 391-397, 2003.

BUSHING, R. W.; BURTON, V. E. Leafhoppers damage to silage corn in California. **Journal of Economic Entomology**, v. 67, n. 5, p. 656-658, 1974.

CAMBRUZZI, A. J.; SCHAINHUK, L.; VIGOLO, J.; BETEMPS, D. L. Levantamento de espécies de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae) no município de Laranjeiras do Sul, Paraná. **Anais do SEPE-Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS**, v. 3, n. 1, p. 1-2, 2013.

CARLONI, E.; CARPANE, P.; PARADELL, S.; LAGUNA, I.; PECCI, M. G. Presence of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and of *Spiroplasma kunkelii* in the Temperate Region of Argentina. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 4, p. 1574-1581, 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: quinto levantamento: fevereiro/2015: safra 2014/2015**. Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_02_13_10_34_06_boletim_graos_fevereiro_2015.pdf>. Acesso em: 18 set. 2015.

COSTA, A. S. Alguns insetos e ácaros usados na transmissão de moléstias de vírus das plantas. **Bragantia**, v. 16, n. 4, p. 15-21, 1957.

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

CRUZ, I.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; VIANA, P. A. Monitoramento de pragas e de inimigos naturais de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em área de plantio integrado de milho braquiária. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 27.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 3.; WORKSHOP SOBRE MANEJO E ETIOLOGIA DA MANCHA BRANCA DO MILHO, 2008, Londrina. **Agroenergia, produção de alimentos e mudanças climáticas: desafios para milho e sorgo: trabalhos e palestras**. [Londrina]: IAPAR; [Sete Lagoas]: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 1 CD-ROM.

DANTHANARAYANA, W. **Insect flight: dispersal and migration**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. 289 p.

DAVIS, R. Biology of the leafhopper *Dalbulus maidis* at selected temperatures. **Journal of Economic Entomology**, v. 59, n. 3, p. 766, 1966.

DELONG, D. M. The genera *Baldulus* and *Dalbulus* in North America including Mexico (Homoptera: Cicadellidae). **Bulletin of the Brooklyn Entomological Society**, v. 45, p. 105-116, 1950.

DENLINGER, D. L. Dormancy in tropical insects. **Annual Review of Entomology**, v. 31, p. 239-264, 1986.

DORST, H. E. **A revision of the leafhoppers of the Macrosteles group (Cicadula of autors) in America north of Mexico**. Washington, DC: Department of Agriculture, 1937. 23 p. (U.S. Department of Agriculture. Miscellaneous publications, 271).

DRAKE, V. A.; GATEHOUSE, A. G. **Insect migration**. Cambridge: University Press, 1995. 478 p.

FLINN, P. W.; HOWER, A. A.; TAYLOR, R. A. J. Immigration, sex ratio, and local movement of the potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) in a Pennsylvania alfalfa field. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, n. 5, p. 1858-1862, 1990.

FRIZZAS, M. R.; OMOTO, C.; SILVEIRA NETO, S.; MORAES, R. C. B. Avaliação da comunidade de insetos durante o ciclo da cultura do milho em diferentes agroecossistemas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 2, p. 9-24, 2003.

GATEHOUSE, A. G. Behavior and ecological genetics of wind-borne migration by insects. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 475-502, 1997.

HEADY, S. E.; MADDEN, L. V.; NAULT, L. R. Oviposition behavior of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, n. 6, p. 723-727, 1985.

HEADY, S. E.; NAULT, L. R. Leafhopper egg microfilaments (Homoptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 77, n. 5, p. 610-615, 1984.

HOOLE, J. C.; JOICE, D. A.; PULLIN, A. S. Estimates of gene flow between populations of the swallowtail butterfly, *Papilio machaon* in Broadland, UK and implications for conservations. **Biological Conservation**, v. 89, p. 293-299, 1999.

JUSTINIANO, W.; FERNANDES, M. G.; VIANA, C. L. T. P. Diversity, composition and population dynamics of arthropods in the genetically modified soybeans Roundup Ready® RR1 (GT 40-3-2) and Intacta RR2 PRO®(MON87701 x MON89788). **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 2, p. 33-44, 2014.

LARSEN, K. J.; NAULT, L. R.; MOYA-RAYAGOSA, G. Overwintering biology of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae): adult population and drought hardiness. **Environmental Entomology**, v. 21, n. 3, p. 566-577, 1992.

LEATHER, S. R.; WALTERS, K. F. A.; BALE, J. S. **The ecology of insect overwintering**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 255 p.

MADDEN, L. V.; NAULT, L. R.; HEADY, S. E.; STYER, W. E. Effect of temperature on the population dynamics of three *Dalbulus* leafhoppers species. **Annals of Applied Biology**, v.

108, p. 475-485, 1986.

MARÍN, R. Biología y comportamiento de *Dalbulus maidis* (Homoptera-Cicadellidae). **Revista Peruana de Entomología**, v. 30, p. 113-117, 1987.

MARTINS, G. M.; TOSCANO, L. C.; TOMQUELSKI, G. V.; MARUYAMA, W. I. Eficiência de inseticidas no controle de *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) na cultura do milho. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 4, p. 196-200, 2008.

MASAKI, S. Summer diapause. **Annual Review of Entomology**, v. 25, p. 1-25, 1980.

MENDES, L. O. T. Observações sobre alguns insetos coletados sobre algodoeiro durante os anos de 1936 e 1937. **Journal de Agronomia**, v. 1, n. 2, p. 149-163, 1938.

MENESES, A. R. **Dinâmica populacional de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) e seus parasitoides em cultivos de milho no nordeste brasileiro**. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí, Teresina.

MOYA-RAYGOZA, G.; HOGENHOUT, S. A.; NAULT, L. R. Habitat of the corn-leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) during the dry (winter) season in Mexico. **Environmental Entomology**, v. 36, p. 1066-1072, 2007.

NAULT, L. R. Evolutionary relationships between maize leafhoppers and their host plants. In: NAULT, L. R.; RODRIGUEZ, J. G. (Ed.). **The leafhoppers and planthoppers**. New York: John Wiley, 1985. p. 309-330.

NAULT, L. R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica**, v. 35, p. 165-175, 1990.

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

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

NAULT, L. R.; MADDEN, L. V. Ecological strategies of *Dalbulus* leafhoppers. **Ecological Entomology**, v. 10, p. 57-63, 1985.

NAULT, L. R.; STYER, W. E. High elevation gamagrass host two new endemic *Dalbulus* species in Mexico (Homoptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 3, p. 257-262, 1994.

OLIVEIRA, C. M. **Variação morfológica entre populações de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae) de algumas localidades do Brasil**. 1996. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S. Cigarrinha-do-milho: aspectos taxonômicos e ecológicos, sobrevivência na entressafra. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (Ed.).

Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 61-88.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; NAULT, L. R. Genetic diversity in populations of *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) from distant localities in Brazil assessed by RAPD-PCR markers.

Environmental Entomology, v. 36, n. 1, p. 204-212, 2007.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; DIAS, C. T. S.; NAULT, L. R. Influence of latitude and elevation on polymorphism among populations of the corn-leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. **Environmental Entomology**, v. 33, p. 1192-1199, 2004.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R.; NAULT, L. R. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 147, n. 2, p. 141-153, 2013a.

OLIVEIRA, C. M.; MOLINA, R. M. S.; ALBRES, R. S.; LOPES, J. R. S. Disseminação de mollicutes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae).

Fitopatologia Brasileira, v. 27, p. 91-95, 2002a.

OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E.; SOUZA, I. R. P.; ALVES, E.; DOLEZAL, W.; PARADELL, S.; REMEZ-LENICOV, A. M. M.; FRIZZAS, M. R. Abundance and species richness of leafhoppers and planthoppers (Hemiptera: Cicadellidae and Delphacidae) in Brazilian maize crops. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 4, p. 1470-1481, 2013b.

OLIVEIRA, E.; CARVALHO, R. V.; DUARTE, A. P.; ANDRADE, R. A.; RESENDE, R. O.; OLIVEIRA, C. M.; RECCO, P. C. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho Sorgo**, v. 1, n. 2, p. 38-46, 2002b.

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O.; GIMÉNEZ PECCI, M. L. P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 19-25, 2003.

OLIVEIRA, E.; TERNES, S.; VILAMIU, R.; LANDAU, E. C.; OLIVEIRA, C. M. Abundance of the insect vector of two different Mollicutes plant pathogens in the vegetative maize cycle. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, n. 1, p. 117-118, 2015.

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

OMAN, P. W. Distribution of *Baldulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Homoptera, Cicadellidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 50, n. 2, p. 34, 1948.

OMAN, P. W. New species and a new genus of North American Deltocefaline leafhoppers (Hemiptera: Homoptera). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.

36, p. 75-81, 1934.

RANKIN, M. A. **Migration**: mechanisms and adaptative significance. Port Aransas: Marine Science Institute, 1985. 868 p.

SILVA, A. G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. 622 p. Parte 2, tomo 1.

SILVA, A. H.; TOSCANO, L. C.; MARUYAMA, W. I.; PEREIRA, M. F. A.; CARDOSO, S. D. M. Controle de *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) DeLong & Wolcott (1923) por *Beauveria bassiana* na cultura do milho. **Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas**, v. 35, n. 4, p. 657-664, 2009.

SILVA, R. F. da. **Ação e doses dos inseticidas lufenuron e lambdacialotrina no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: noctuidae)**. 2008. 69 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu.

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

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

TAYLOR, L. R. Insect migration flight periodicity, and boundary layer. **Journal of Animal Ecology**, v. 43, p. 225-238, 1974.

TAYLOR, R. A. J.; NAULT, L. R.; STYER, W. E. Experimental analysis of flight activity of three *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Auchenorrhyncha) in relation to migration. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 86, p. 655-667, 1993.

TERAGUCHI, S. E. Migration patterns of leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) in an Ohio old field. **Environmental Entomology**, v. 15, p. 1199-1211, 1986.

TODD, J. L.; MADDEN, L. V.; NAULT, L. R. Comparative growth and spatial distribution of *Dalbulus* leafhoppers populations (Homoptera: Cicadellidae) in relation to maize phenology. **Environmental Entomology**, v. 20, n. 2, p. 556-564, 1991.

TRIPLEHORN, B. W.; NAULT, L. R. Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the Macrostelini. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, n. 3, p. 291-315, 1985.

WAQUIL, J. M. Amostragem e abundância de cigarrinhas e danos de *Dalbulus maidis* (DeLong e Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) em plântulas de milho. **Anais da Sociedade**

Entomológica do Brasil, v. 26, n. 1, p. 27-33, 1997.

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

ZURITA, Y. A.; ANJOS, N.; WAQUIL, J. M. Aspectos biológicos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) em Híbridos de Milho (*Zea mays* L.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 2, p. 347-352, 2000.

Capítulo 10

Técnicas de criação da cigarrinha-do-milho para estudos de transmissão e de controle biológico

Charles Martins de Oliveira | João Roberto Spotti Lopes | Ranyse Barbosa Querino



Introdução

A transmissão do vírus "*Rice dwarf virus*" para plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), por meio da cigarrinha *Recilia dorsalis* (Motschulsky) (Hemiptera: Cicadellidae), em 1883, representa o

primeiro relato de transmissão de um fitopatógeno por um inseto (FUKUSHI, 1969). Desde então, o estudo com insetos-vetores, no mundo, se desenvolveu fortemente e atualmente se consolida como uma importante área de pesquisa na Entomologia.

Entre os insetos fitófagos, representados por dez ordens (STRONG et al., 1984), somente Hemiptera, Coleoptera e Thysanoptera apresentam espécies vetoras de fitopatógenos. Os Hemiptera (subordens Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha) são os mais importantes em termos de número de vetores e fitopatógenos transmitidos (NAULT, 1997).

A cigarrinha *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) é o principal inseto vetor em milho no Brasil. Possui ampla distribuição geográfica e é a espécie mais abundante entre os Cicadellidae que habitam a cultura do milho (OLIVEIRA et al., 2004, 2013). Essa espécie é responsável pela transmissão de um vírus (*Maize rayado fino* – MRFV, grupo *marafivirus*) e dos mollicutes causadores dos enfezamentos (*Maize Bushy Stunt Phytoplasma* – MBSP e *Corn Stunt Spiroplasma* – CSS) (NAULT, 1980, 1990). As doenças causadas principalmente pelos mollicutes, espiroplasma e fitoplasma, apresentam importância econômica, sobretudo, na região Centro-Sul do País (MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002a, 2003).

O controle biológico é uma ferramenta importante dentro do Manejo Integrado de Pragas. Para o controle da cigarrinha-do-milho, atualmente existem 15 produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), sendo 14 inseticidas (em sua maioria neonicotinoides) e um produto biológico à base de *Beauveria bassiana*. Alguns estudos, entretanto, têm demonstrado a baixa eficiência destes produtos em evitar a transmissão dos

fitopatógenos pela cigarrinha (OLIVEIRA et al., 2007). Nesse contexto, estudos visando conhecer o complexo de inimigos naturais podem ser importantes para o desenvolvimento de alternativas que permitam o aprimoramento do manejo integrado de *D. maidis* em milho.

Para o entendimento do complexo de relações entre insetos, fitopatógenos e plantas é desejável produzir em laboratório populações das espécies de insetos de interesse. Isso permite a realização de estudos mais detalhados sobre o vetor e suas relações com os fitopatógenos, plantas hospedeiras e seus inimigos naturais. A criação dos insetos-vetores é, portanto, uma etapa fundamental em estudos de transmissão de fitopatógenos e para estudos de controle biológico, sendo necessário conjugar procedimentos de uso geral para a manutenção de quaisquer populações de insetos vivos com o desenvolvimento de técnicas específicas para um determinado vetor que se quer estudar.

Este capítulo descreve aspectos gerais e específicos da criação da cigarrinha-do-milho, *D. maidis*, bem como de técnicas para aquisição e inoculação de vírus e de mollicutes por esse vetor, tendo em vista estudos de transmissão ou de melhoramento genético do milho para a resistência a esses agentes etiológicos, além de estudos referentes aos seus inimigos naturais.

Características da transmissão de mollicutes e de vírus por *D. maidis*

O conhecimento das etapas envolvidas na transmissão de fitopatógenos por *D. maidis* é fundamental para o desenvolvimento de técnicas para a criação, manutenção e utilização desse inseto-vetor em bioensaios de transmissão.

Período de acesso à aquisição (PAA)

Período de tempo de exposição a uma planta infectada, necessário para que o inseto-vetor adquira o fitopatógeno. Esse período pode variar de poucos segundos, no caso da transmissão não persistente de vírus (por exemplo, *Maize dwarf mosaic potyvirus*) por afídeos através de picadas de prova, até muitas horas ou dias para patógenos vasculares, tais como MRFV e os mollicutes (fitoplasma e espiroplasma). Após a aquisição, o inseto estará apto a transmitir o patógeno imediatamente, ou será necessário que passe um determinado período de tempo (latência) para que isso aconteça, dependendo da relação entre o vetor e o fitopatógeno.

Período latente

Período de tempo entre o início da aquisição do fitopatógeno pelo inseto-vetor em planta infectada e o momento em que ele estará apto a transmiti-lo para outras plantas, podendo ser esse tempo de algumas horas a dias ou semanas. Em geral, ocorre período latente quando o fitopatógeno é circulativo ou propagativo no vetor. Nos casos em que o fitopatógeno se restringe às peças bucais ou à porção anterior do tubo digestivo (estomodéu) (transmissão não circulativa), esse período de latência não existe.

Período de acesso à inoculação (PAI)

Período de tempo necessário para que o inseto-vetor (já infectante) se alimente em planta sadia e inocule o fitopatógeno. Assim como o PAA, o PAI também pode variar de alguns segundos a vários minutos ou horas, dependendo da relação fitopatógeno-vetor.

Retenção no vetor

Período de tempo que o inseto vetor permanece infectante após começar a transmitir o fitopatógeno. Esse tempo pode variar de alguns minutos a meses, dependendo da relação fitopatógeno/vetor, sendo que no caso de patógenos propagativos, os vetores usualmente permanecem infectantes por toda a vida. Informações mais detalhadas sobre conceitos e terminologias relacionados à transmissão de fitopatógenos por vetores estão fora do escopo deste capítulo e podem ser obtidas em Nault (1997).

Para estudos com *D. maidis*, recomenda-se PAA e PAI de 96 horas. Embora alguns estudos tenham demonstrado que períodos mais curtos são suficientes para a aquisição e inoculação desses fitopatógenos (PANIAGUA; GÁMEZ, 1976; MARKHAM; ALIVIZATOS, 1983; LEGRAND; POWER, 1994), o período de 96 horas garante maior eficiência tanto na aquisição como na inoculação por *D. maidis*. O tempo que as cigarrinhas devem ser mantidas sobre plantas saudias, entre a aquisição e o momento em que estarão aptas a transmitirem os fitopatógenos, correspondente ao período latente no vetor, deve ser de 28 a 30 dias. Findo o período latente, preferencialmente, deve-se utilizar as cigarrinhas em bioensaios de transmissão por um período de até 21 dias, uma

vez que a taxa de transmissão dos fitopatógenos decresce com o tempo.

Infraestrutura e materiais para estudos com *D. maidis*

Estudos com insetos-vetores, principalmente sugadores, envolvem a manipulação e a manutenção de material biológico vivo. Uma vez que a criação desses insetos em dietas artificiais é muito laboriosa e quase impraticável para estudos de transmissão, há a necessidade de se ter também plantas vivas para a manutenção das colônias de insetos e para serem submetidas a bioensaios de transmissão. Assim, estudos desse tipo requerem infraestrutura e materiais específicos. A seguir são descritos detalhes de infraestrutura, equipamentos e materiais requeridos para estudos com a cigarrinha-do-milho.

Infraestrutura

Salas e laboratórios

Necessários para realização de identificação taxonômica dos insetos, excisão de ovos para obtenção de colônias de cigarrinhas sadias, manipulação dos insetos para fornecimento de alimento, bioensaios de transmissão e testes de detecção dos fitopatógenos nos insetos e plantas por meio de testes sorológicos ou moleculares.

Viveiros ou casas de vegetação

Para a manutenção de colônias de cigarrinhas infectantes e plantas de milho contendo os fitopatógenos, bem como de colônias de cigarrinhas sadias e de plantas sadias para alimentação das cigarrinhas, e para serem usadas em bioensaios de transmissão, há a necessidade de se ter viveiros telados (tela antiafídica) pequenos (Figura 1) ou compartimentos isolados de casa de vegetação. Além desses, é necessário que se tenha um viveiro telado ou casa de vegetação de maiores dimensões para estudos que envolvem a inoculação de um grande número de plantas de milho, que muitas vezes são conduzidas em vasos até a produção (Figura 2).

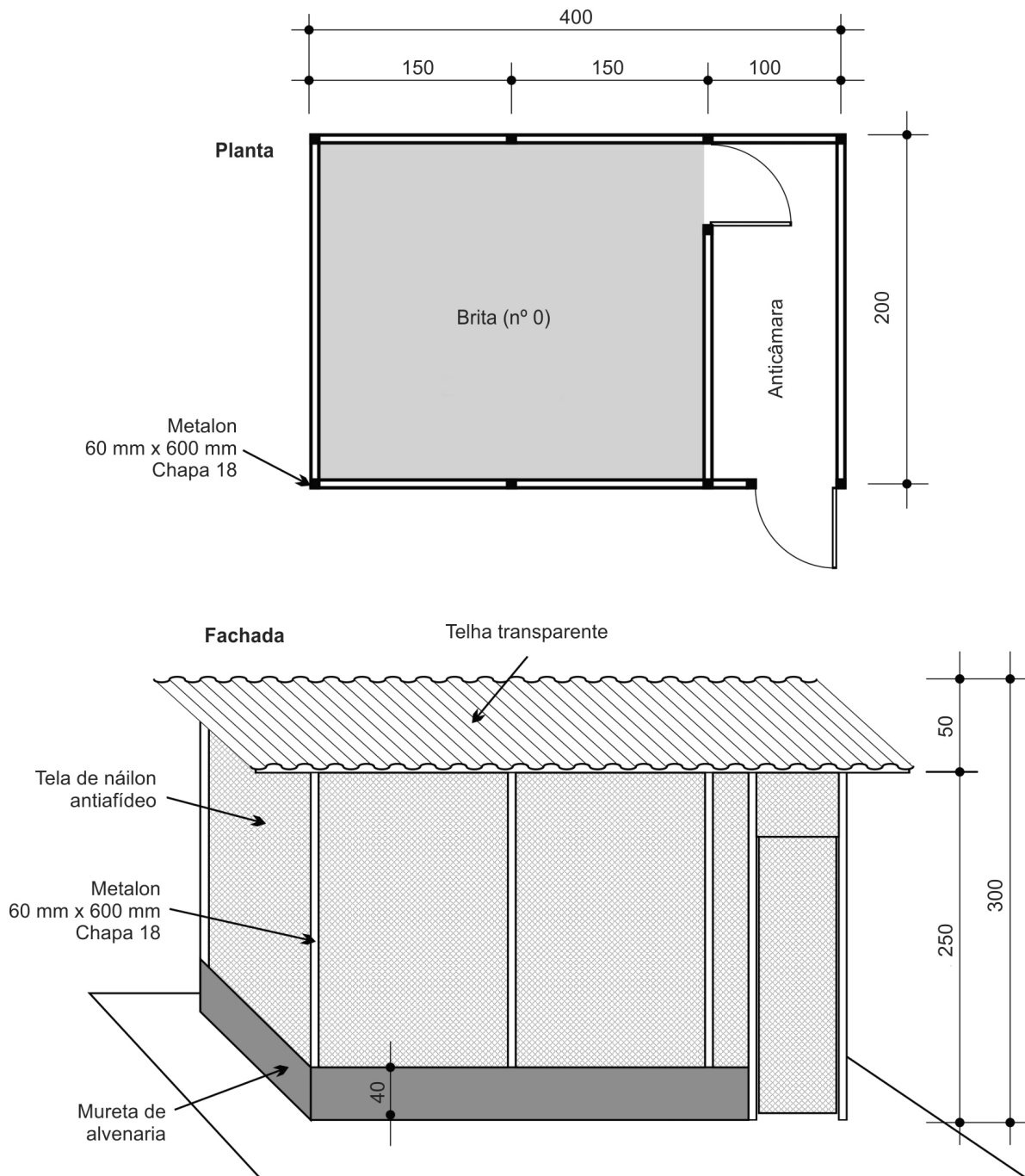


Figura 1. Viveiro para manutenção de plantas-fonte (fitoplasma, espiroplasma ou MRFV) ou plantas sadias.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

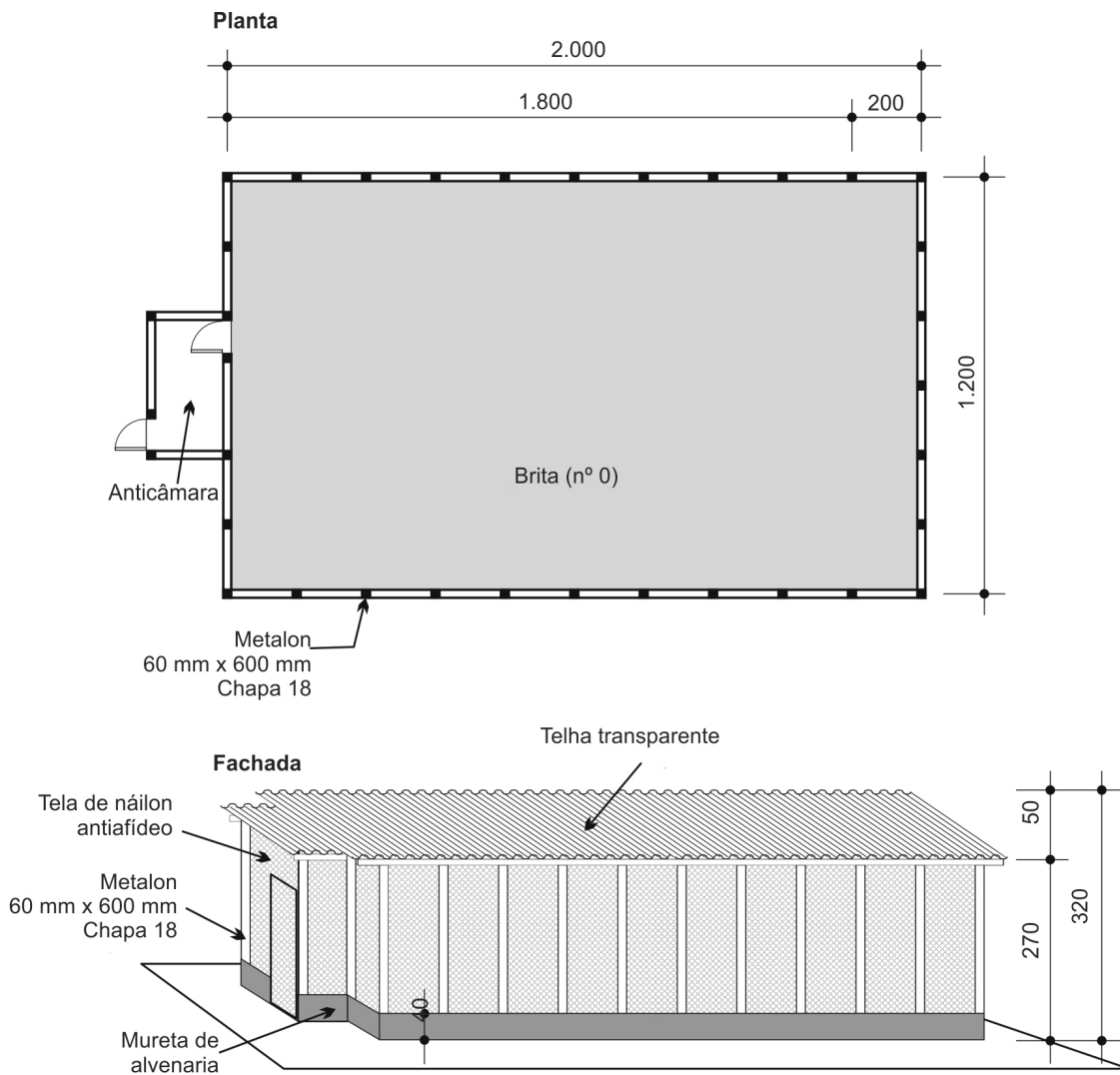


Figura 2. Viveiro para condução de experimentos de transmissão.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Equipamentos

Microscópio estereoscópico

Para a identificação taxonômica e excisão de ovos da cigarrinha de folhas de milho, necessita-se de um microscópio estereoscópico ou

lupa com aumento mínimo de 10 vezes.

Compressor/aspirador

Adaptado a um aspirador bucal, pode ser utilizado para se recolher cigarrinhas durante os procedimentos de fornecimento de alimento e separação de espécimes a serem utilizados em bioensaios de transmissão. Pode-se usar nesse caso um compressor/aspirador de 0,55 kW.

Câmaras climatizadas

Em muitos estudos de transmissão existe a necessidade de um controle rigoroso de temperatura, umidade e luminosidade, podendo-se utilizar câmaras de crescimento de plantas ou câmaras climáticas microprocessadas (“*walk in*”).

Microcomputador

Utilizado para tabulação e análise dos dados dos experimentos, redação e editoração de artigos científicos e outros.

Materiais

Rede entomológica

Rede constituída por um saco de tecido “voil” com formato cônico e fundo arredondado, em cuja abertura há uma bainha, pela qual passa um arco de metal que se prende a um cabo de madeira por meio de uma abraçadeira de metal (Figura 3). A rede entomológica é utilizada para se coletar espécimes de *D. maidis* no campo por

meio de batidas sucessivas sobre as plantas de milho. Deve-se ressaltar que o tecido a ser utilizado não pode ser o filó, uma vez que as cigarrinhas são diminutas e passam pelas malhas desse tecido.

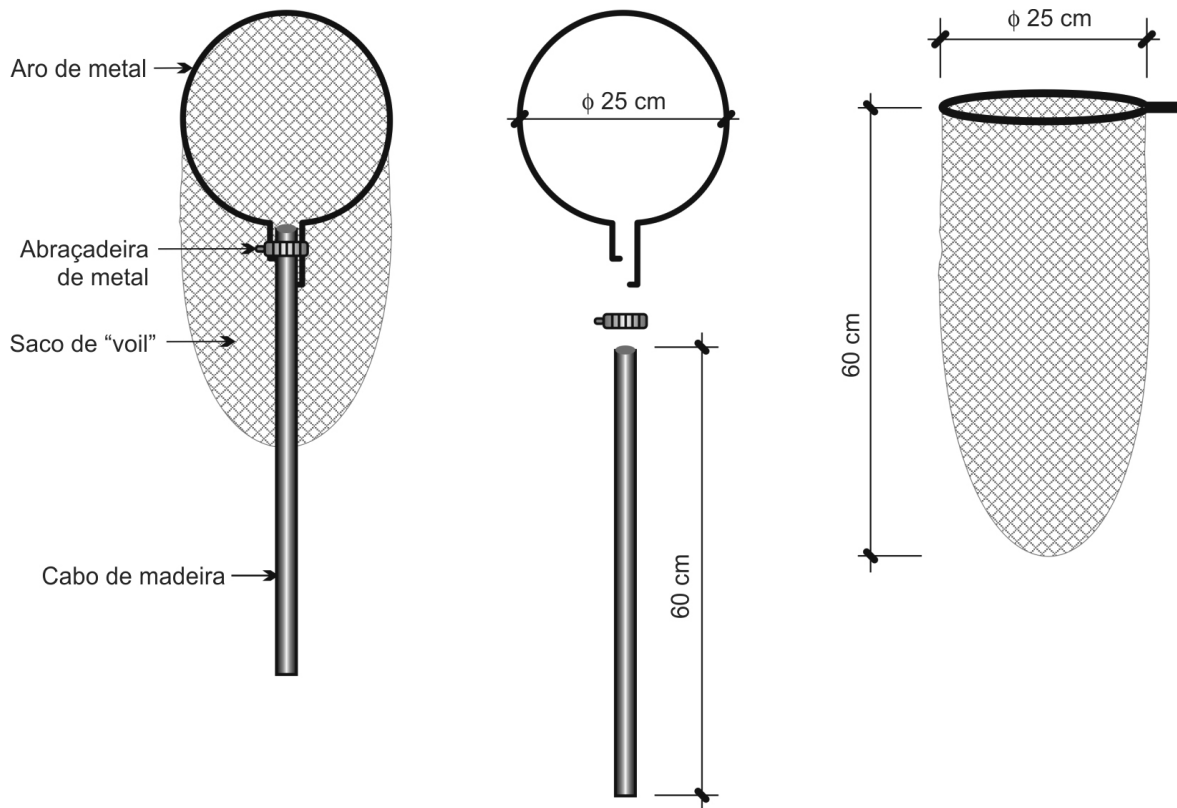


Figura 3. Rede entomológica.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Aspirador bucal

Equipamento construído com um tubo de vidro ou de plástico transparente, ao qual, em uma das extremidades, é encaixada uma mangueira de plástico de menor diâmetro envolta por um pedaço de tecido "voil" (Figura 4). O aspirador permite que os espécimes de cigarrinhas sejam sugados e fiquem encerrados no interior do tubo. Pode ser utilizado para recolher as cigarrinhas durante os procedimentos de fornecimento de alimento e separação de

espécimes a serem utilizados em bioensaios de transmissão em laboratório, ou para coleta das cigarrinhas em campo, diretamente do cartucho das plantas de milho.

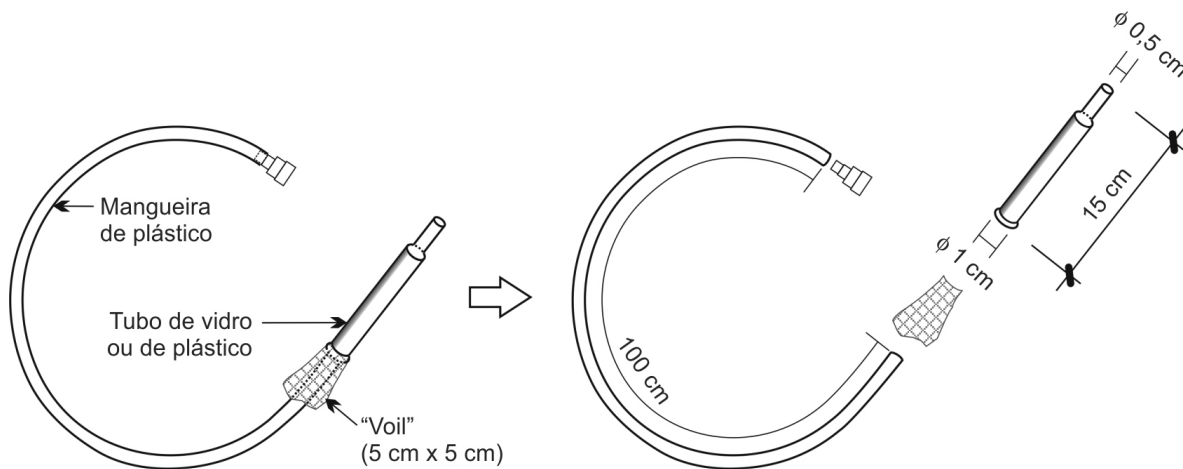


Figura 4. Aspirador bucal.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Pinças e estiletos

Utilizados nos procedimentos de excisão de ovos de *D. maidis* de folhas de milho para obtenção de colônias de cigarrinhas isentas de fitopatógenos, e também durante a manipulação de espécimes submetidos à identificação taxonômica.

Caixa de manipulação

Caixa preta de madeira contendo uma das laterais aberta, voltada para o manipulador. No fundo, são instaladas três lâmpadas fluorescentes, colocadas atrás de uma chapa de acrílico branco-leitoso. Esta caixa de manipulação deve ser assentada sobre uma mesa ou suporte a uma altura de 80 cm a 90 cm, que permite o trabalho pelo manipulador. Na porção superior da abertura da caixa

é preso um pano preto que, quando puxado, permite que o manipulador fique no interior da caixa, isolado do meio externo (Figura 5). Os cicadelídeos em geral, incluindo *D. maidis*, apresentam fototropismo positivo. Por ocasião da manipulação das cigarrinhas, o pano preto é puxado e as lâmpadas no fundo da caixa são acesas. Desta forma, ao serem soltas dentro da caixa as cigarrinhas são atraídas pela luminosidade e permanecem sobre a chapa de acrílico que antecede as lâmpadas, sendo facilmente recolhidas por um aspirador bucal. É possível também utilizar essa caixa em sala escura, de forma mais confortável, sem a necessidade de utilização do pano preto sobre o manipulador. As caixas de manipulação são utilizadas no laboratório ou nos viveiros, durante os procedimentos de fornecimento de alimento e separação de espécimes a serem utilizados em bioensaios de transmissão.

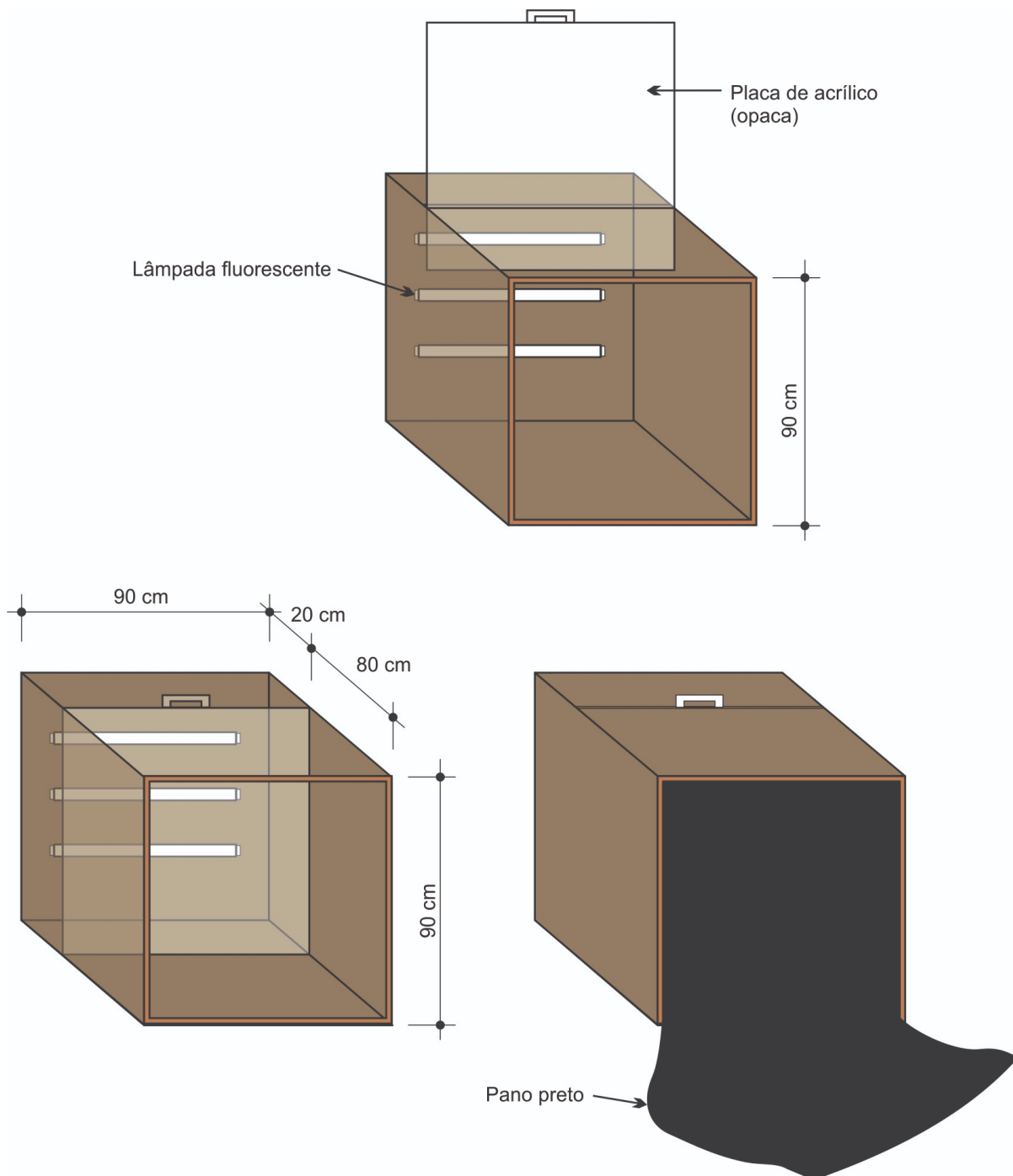


Figura 5. Caixa de manipulação.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Gaiolas de criação

Confeccionadas com armação de esquadrias de alumínio, sendo o fundo das gaiolas fechado com chapa de alumínio, e o teto e todas as laterais, com exceção de uma que é utilizada como porta (acrílico transparente), fechados com tecido tipo “voil”, para permitir a ventilação. Nas canaletas das esquadrias de alumínio, o tecido de “voil” é preso utilizando-se borracha de vedação (borracha utilizada para vedação de estruturas de alumínio e vidro) colocada com pressão, o que permite que o tecido seja trocado sempre que se rasgar ou se tornar velho. As portas das gaiolas são confeccionadas em acrílico transparente, e possuem um pequeno orifício no seu terço superior, o qual permite a introdução das cigarrinhas na gaiola por meio de aspirador bucal. São fechadas com elásticos que se prendem a dois pares de parafusos (um superior e outro inferior) nas laterais das caixas. Em todo o perímetro das portas são coladas tiras de espuma adesiva, que garantem a vedação completa delas quando fechadas. É necessária também a aplicação de silicone na parte interna das gaiolas, na junção entre as esquadrias de alumínio, para vedar frestas que poderiam permitir a fuga dos insetos (Figura 6). As gaiolas de criação são utilizadas para a manutenção de colônias de cigarrinhas sadias e de colônias de cigarrinhas infectadas com os fitopatógenos.

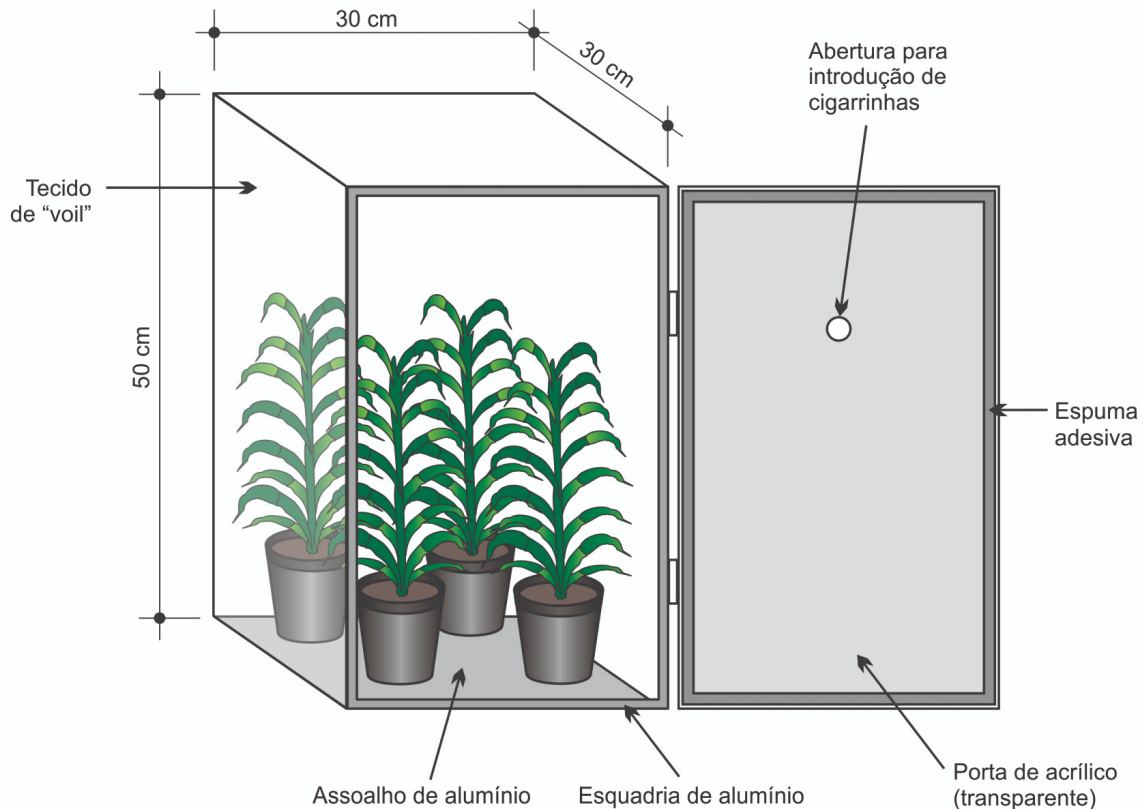


Figura 6. Gaiola de criação.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Gaiolas de confinamento

Constituídas de garrafas de plástico transparente (refrigerante 2 litros), tipo PET, cujo fundo é retirado. Nas laterais das garrafas são feitas duas aberturas, as quais são cobertas com tecido "voil", para a ventilação. As gaiolas são colocadas sobre as plantas de milho e fixadas ao solo por um suporte metálico (Figura 7). As gaiolas são utilizadas para o confinamento de cigarrinhas sobre plântulas de milho, durante os bioensaios de transmissão. Outros tipos de gaiolas para confinamento de cigarrinhas nas plântulas ou nas folhas das plântulas de milho podem ser adaptados.

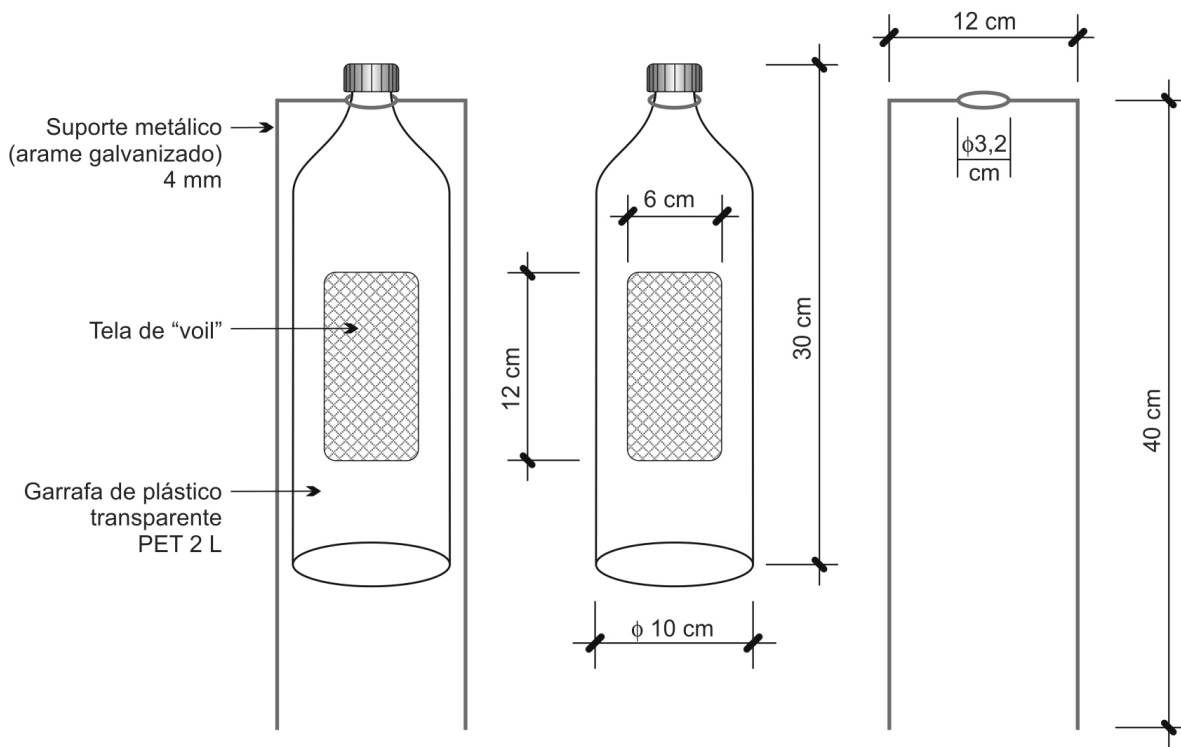


Figura 7. Gaiola de confinamento.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Sacos de confinamento

Confeccionados em tecido “voil”, têm a forma cônica e fundo arredondado, semelhante à descrição de rede entomológica. Possuem um pequeno orifício no terço superior, que é vedado com velcro, para permitir a introdução das cigarrinhas por meio de aspirador bucal (Figura 8). São utilizados para o confinamento de cigarrinhas sobre plantas de milho de até 50 cm de altura, ou para plantas maiores ou completamente desenvolvidas, encerrando em seu interior as folhas da parte superior, sendo a base do saco amarrada ao caule da planta.

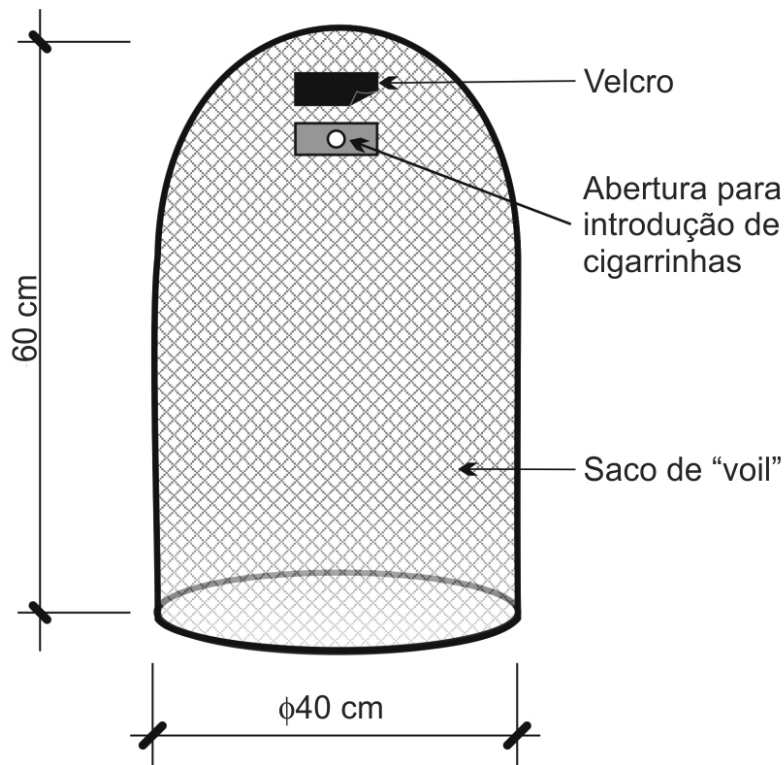


Figura 8. Saco de confinamento.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Gaiolas e caixas para transporte

As gaiolas para transporte de cigarrinhas são semelhantes às descritas para a criação desses insetos, porém, com menores dimensões (Figura 9A). As caixas para transporte podem ser construídas utilizando-se vasilhas plásticas transparentes, às quais se adiciona uma camada de gesso ao fundo, na qual previamente se trança uma malha de arame, para proporcionar a fixação do gesso. Na tampa dessas caixas há orifícios protegidos por tela de náilon antiafídica para ventilação, e um orifício para a introdução das cigarrinhas por meio de aspirador bucal, o qual é posteriormente fechado com uma rolha (Figura 9B). São utilizadas na coleta de indivíduos de *D. maidis* no campo, permitindo a manutenção dos insetos vivos por períodos prolongados de tempo (dias), durante o

transporte para o laboratório. Nas gaiolas são colocados pequenos vasos contendo plantas de milho, e nas caixas colocam-se pedaços de folhas de milho frescas, havendo a necessidade de se umedecer o gesso periodicamente.

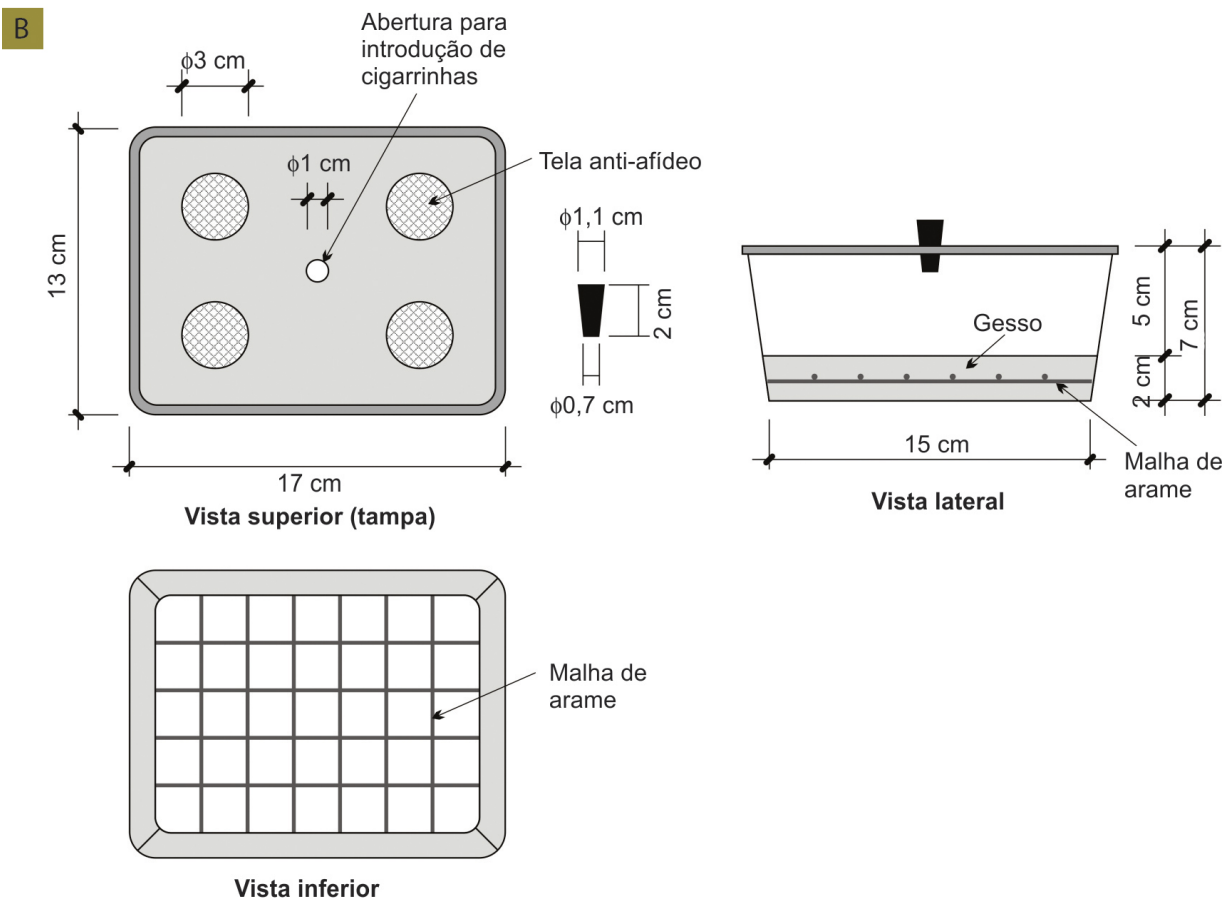
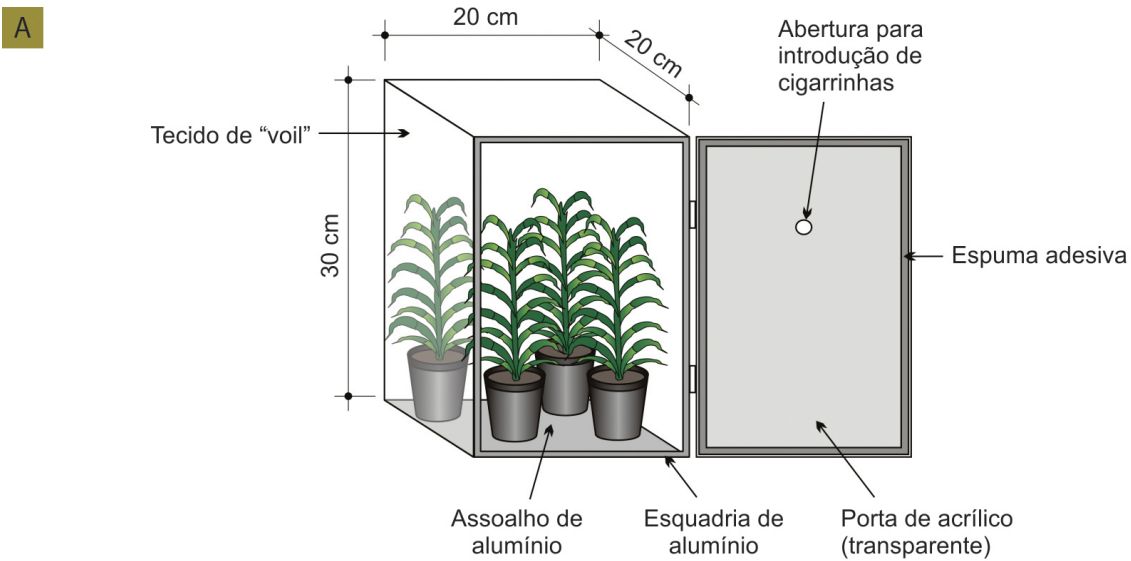


Figura 9. Gaiola para transporte (A) e caixa para transporte (B).

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Vasos

Os vasos plásticos devem ter tamanhos variados (Figura 10). Os vasos menores (Figuras 10A e 10B) se prestam para o plantio de milho utilizado na manutenção das colônias de cigarrinhas e inoculações de plantas a serem utilizadas posteriormente como fonte de inóculo dos fitopatógenos. Os vasos maiores (Figuras 10C e 10D) são usados para a condução das plantas de milho utilizadas nos bioensaios de transmissão, muitas vezes até a produção.

Substrato, solo e adubos

Nos vasos pequenos (Figuras 10A e 10B), pode-se utilizar substrato orgânico comercial (constituído por vermiculita, casca de pinus e fertilizantes) para o plantio do milho que será utilizado na alimentação das cigarrinhas e nas inoculações visando manutenção de fonte de inóculo dos fitopatógenos. Esse tipo de substrato orgânico, parcialmente constituído por vermiculita, tem a vantagem de ser mais leve que solo e vir previamente adubado. Para as plantas inoculadas em bioensaios de transmissão, cultivadas em vasos maiores (Figuras 10C e 10D) até a produção, utiliza-se solo previamente analisado e adubado segundo recomendação técnica, fazendo-se adubações nitrogenadas de cobertura. Nesse caso, a não utilização de substrato se deve às grandes quantidades requeridas, o que gera um alto custo.

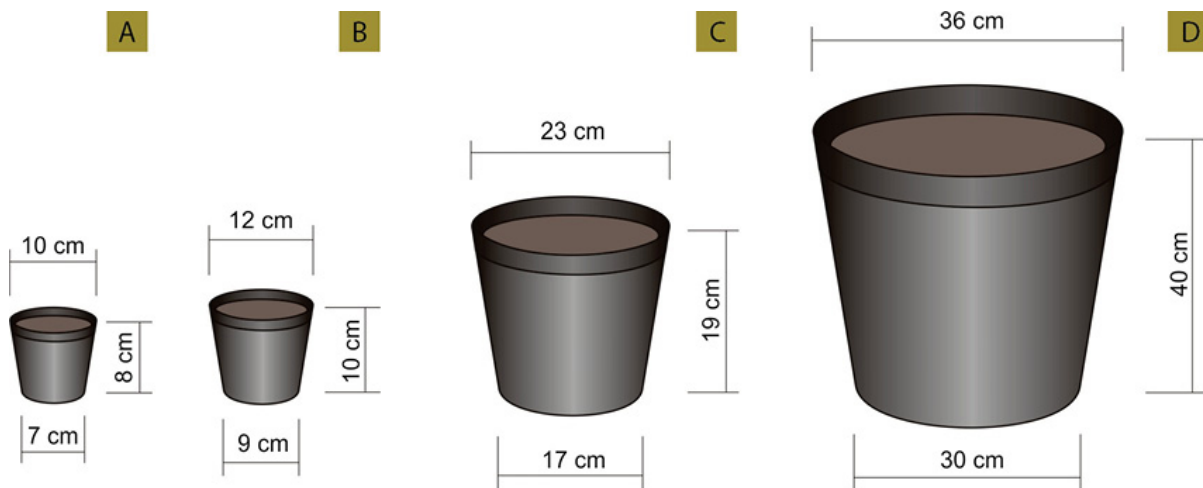


Figura 10. Vasos de plásticos pequenos (A e B) e vasos de plásticos grandes (C e D).

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Etiquetas, fitas adesivas e caderno de registro

As etiquetas podem ser confeccionadas em madeira ou, preferencialmente, em plástico, e permitem a identificação dos vasos que contêm as plantas utilizadas nos bioensaios de transmissão, devendo as inscrições ser grafadas com lápis ou com caneta indelével, cuja grafia não se apague pela exposição contínua ao sol. A fita adesiva (fita crepe) é utilizada para a identificação das colônias de cigarrinhas e deve ser grafada utilizando-se caneta indelével. A identificação dos vasos deve conter no mínimo as seguintes informações: título do experimento, cultivar de milho utilizada, número da repetição, o tipo de fitopatógeno ou se é material sadio, e a data. Para as colônias, dependendo do fim a que se destinam, a identificação deve abranger: nome do vetor, o tipo de fitopatógeno ou se é material sadio, localidade de coleta, finalidade (oviposição, aquisição ou transmissão dos fitopatógenos, período latente), e a data. É importante salientar que, além da identificação feita com as etiquetas e fitas adesivas, é indispensável se ter um

caderno de registro que deverá conter informações mais detalhadas sobre cada bioensaio de transmissão e cada uma das colônias.

Criação de *D. maidis*, manutenção de isolados dos fitopatógenos e bioensaios de transmissão

A seguir são descritos os procedimentos envolvidos nas principais etapas da criação da cigarrinha-do-milho e manutenção dos isolados de fitoplasma, de espiroplasma e de MRFV, bem como técnicas utilizadas para a inoculação artificial desses fitopatógenos, que estão esquematizadas na Figura 11.

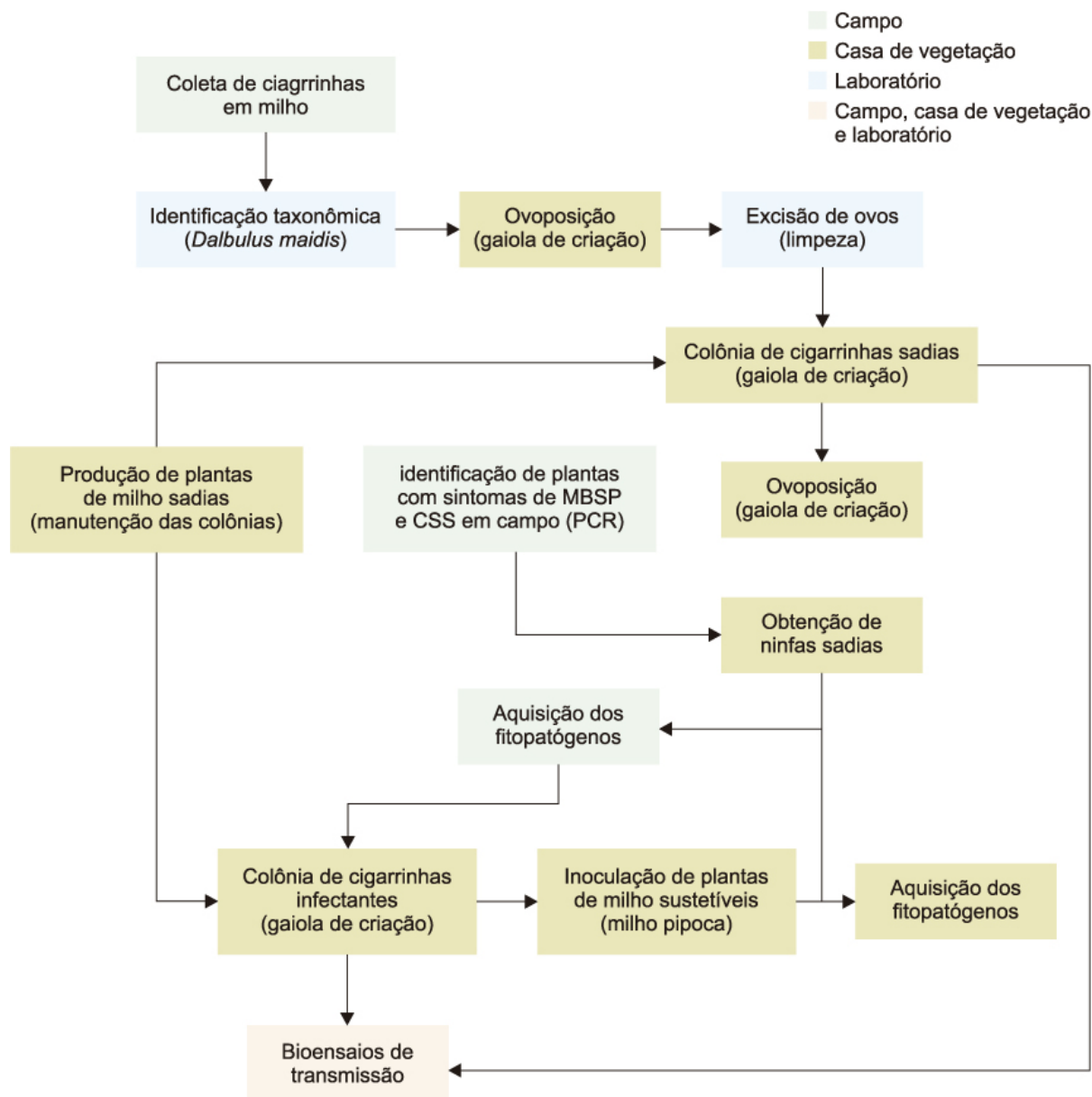


Figura 11. Principais etapas da criação de *Dalbulus maidis* e de obtenção e manutenção dos fitopatógenos, para utilização em bioensaios de transmissão.

Colônias de *D. maidis* isentas de fitopatógenos

A cigarrinha-do-milho não possui transmissão vertical ou transovariana dos fitopatógenos, fitoplasma, espiroplasma e MRFV, ou seja, esses fitopatógenos não são transmitidos da mãe para a progênie através dos ovos no decorrer das gerações (GONZALES;

GÁMEZ, 1974; ALIVIZATOS; MARKHAM, 1986). Assim, pode-se obter uma colônia de cigarrinhas sadias da seguinte forma:

Coleta de cigarrinhas no campo

Cigarrinhas adultas devem ser coletadas no campo por meio de batidas sucessivas de rede entomológica sobre plantas de milho ou coletando-se os espécimes diretamente do cartucho das plantas por meio de aspirador bucal. Apesar de a cigarrinha-do-milho estar presente durante todo o ciclo da cultura do milho (TODD et al., 1991), a coleta deve ser feita preferencialmente em lavouras onde as plantas têm de 30 cm a 50 cm de altura, pois as essas não estarão nem tão pequenas que possam ser danificadas pelas batidas da rede entomológica e nem tão grandes que dificultem o livre caminhar na lavoura, além do fato de possuírem o cartucho, que é o sítio preferencial para adultos de *D. maidis*. Os insetos coletados devem ser colocados em gaiolas ou caixas de transporte (Figuras 9A e 9B) e levados vivos ao laboratório, onde serão soltos na caixa de manipulação (Figura 5), e os adultos da cigarrinha-do-milho serão separados. Recomenda-se a coleta de no mínimo 200 adultos de cigarrinha.

Identificação taxonômica

Após a separação dos adultos, deve-se retirar uma pequena amostra de indivíduos (cerca de 10) para a identificação taxonômica. A identificação específica é procedida mediante o exame do sétimo esternito da fêmea, e principalmente pelo exame da genitália masculina. Mais detalhes sobre a preparação da

genitália e identificação taxonômica específica podem ser obtidos em Menezes (1972), Triplehorn e Nault (1985) e Oliveira (1996).

Oviposição

Os adultos de *D. maidis* coletados devem ser colocados em uma gaiola de criação (Figura 6) contendo dois vasos pequenos (Figura 10A) com três plantas de milho sadias cada, no estágio de 4 a 5 folhas ou cerca de 15 a 20 dias após emergência. Devem permanecer por 2 a 3 dias sobre essas plantas (período de acesso à oviposição) para realizarem a postura. Após esse período, os adultos devem ser mortos. O número reduzido de plantas submetidas à postura tem por finalidade concentrar os ovos no tecido vegetal, o que facilitará a etapa posterior, que é a retirada dos ovos.

Retirada dos ovos

Após a postura, as plantas de milho devem permanecer nas gaiolas de criação (Figura 6) por aproximadamente 5 dias. Em seguida, uma vez que a postura é endofítica, as plantas devem ser cortadas e as suas folhas, dissecadas ao microscópio estereoscópico, utilizando-se estiletes e pinças, sendo os ovos da cigarrinha-do-milho retirados. A dissecação deve ser feita abrindo-se preferencialmente a nervura central das folhas, pois é onde se concentra o maior número de ovos. Os ovos de *D. maidis* são de coloração branca, com córion transparente e medem cerca de 1,3 mm. A região do opérculo é mais delgada que o extremo posterior. Os ovos podem ser depositados isolados, em pares ou grupos de 5 ou 6, na superfície superior das folhas (MARÍN, 1987). Ao se tornarem mais

velhos, adquirem uma coloração mais opaca e pode-se visualizar duas manchas vermelhas que correspondem aos olhos das ninfas, e também microfiosentos esbranquiçados que se expõem na superfície das folhas. Os ovos retirados devem ser colocados em uma placa de Petri forrada com papel de filtro umedecido com água destilada. O papel filtro deve ser previamente esterilizado com uma solução de hipoclorito de sódio 3% por 10 minutos e lavado em água destilada por 10 minutos. Posteriormente, a placa de Petri deve ser coberta com tecido "voil" preso por um elástico, para a ventilação, e mantida em temperatura ambiente durante o período de incubação, sendo o papel de filtro umedecido pelo menos duas vezes ao dia para se evitar o ressecamento. O período de 5 dias entre a postura e a retirada dos ovos é para se obter ovos em estágio mais avançado de incubação, tornando-se mais resistentes ao manuseio. E também para que eles permaneçam o menor tempo possível na placa de Petri, evitando riscos de contaminação por fungos, o que é muito comum após períodos mais prolongados.

Outra maneira é colocar os ovos retirados em uma pequena caixa plástica (Figura 12) formada por duas partes. A parte inferior é forrada com papel filtro umedecido e recebe os ovos, como descrito anteriormente. A parte superior contém um orifício protegido por tecido "voil". Então, utilizando-se um vaso contendo uma planta de milho sadia (20 dias após a emergência) uma de suas folhas é colocada entre as duas partes da caixa plástica contendo os ovos, formando-se um "sanduíche". As duas partes da caixa são mantidas juntas, presas por um elástico, sendo sustentadas por uma haste de metal, para que a folha não se quebre. A região da caixa plástica que entra em contato com a folha é forrada por uma espuma, para se evitar danos pela pressão exercida pelas duas partes da caixa.

Pelo orifício de ventilação pode-se realizar o umedecimento diário do papel filtro, como descrito anteriormente.

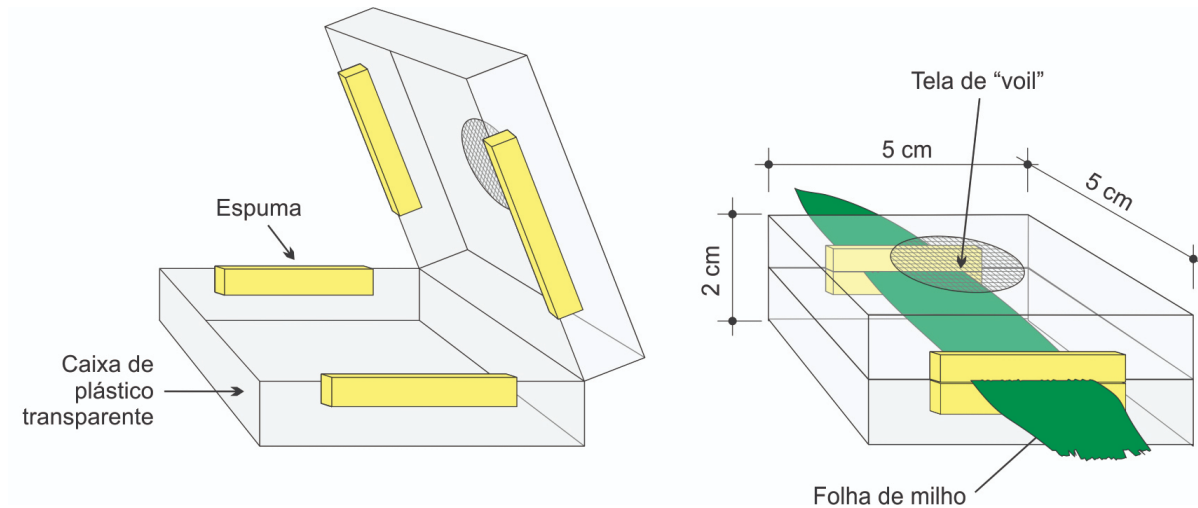


Figura 12. Caixinhas de plástico utilizadas para incubação de ovos.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Transferência de ninfas para plantas sadias

O período de incubação para *D. maidis* a 26 °C é de aproximadamente 8 a 9 dias (TSAI, 1988; WAQUIL et al., 1999), portanto, as ninfas começarão a eclodir cerca de 2 a 3 dias após a retirada dos ovos. No caso dos ovos colocados em placa de Petri, deve-se efetuar inspeções diárias da placa, e as ninfas eclodidas devem ser transferidas para plantas de milho sadias, colocadas em gaiolas de criação (Figura 6), utilizando-se um pincel fino. Para os ovos colocados na caixa plástica (Figura 12), após a eclosão, as ninfas passarão diretamente para a folha de milho que se encontra entre as duas partes da caixa. Assim, a cada 2 a 3 dias, ela deve ser aberta, cuidadosamente, dentro da caixa de manipulação (Figura 5) para inspeção, e pode ser mudada a folha nessa ocasião, deixando-se as ninfas já eclodidas livres para se movimentarem pela planta de milho, dentro da gaiola de criação.

Manutenção da colônia

A manutenção das colônias deve ser feita oferecendo-se plantas de milho sadias com 15 a 20 dias após a emergência. As gaiolas de criação (Figura 6) devem ser inspecionadas diariamente e sempre que um ou mais vasos apresentarem plantas mortas ou muito debilitadas deve-se efetuar a troca por plantas novas. A periodicidade dessa troca, em geral, deve ser feita em função do tamanho da população de cigarrinhas, e da temperatura ambiente. Uma população grande de cigarrinhas e temperaturas elevadas encurtam o período de troca das plantas. Vale salientar que se faz necessário ter as gaiolas de criação, contendo as cigarrinhas, preenchidas com o máximo de vasos possível, para que a maioria das plantas permaneça viva por um período superior a 10 dias, o que permite os processos de oviposição e eclosão de ninfas, que garantirá o crescimento da colônia.

Preparo de “vouchers”

Visando ter exemplares de cigarrinhas para comparações em estudos posteriores, deve-se separar uma pequena amostra das cigarrinhas obtidas, devidamente identificadas taxonomicamente e depositá-las no museu de Entomologia da instituição onde estão sendo realizados os estudos com *D. maidis*. Espécimes (machos e fêmeas) de *D. maidis* podem ser colados em pequenos triângulos de cartolina presos a alfinetes entomológicos. No caso dos machos, deve-se colocar o abdômen contendo a genitália utilizada na identificação dentro de microtubos de plástico ou de vidro, contendo glicerina, fechados com uma microrrolha, que é atravessada pelo mesmo alfinete entomológico, que contém o restante do corpo do inseto.

Obtenção e manutenção de isolados de mollicutes e de vírus

Identificação de fonte de inóculo no campo

Plantas com sintomas de enfezamentos, associados aos mollicutes (fitoplasma e espiroplasma), e da virose denominada “Risca” (causada pelo MRFV) devem ser identificadas no campo. Geralmente esses sintomas são mais visíveis por ocasião do enchimento dos grãos. Mais detalhes sobre a sintomatologia referentes a essas doenças podem ser obtidos em Nault (1980), Fernandes e Oliveira (2000) e Oliveira et al. (2002b). Para comprovação da presença isolada dos fitopatógenos, fitoplasma e espiroplasma, amostras de folhas sintomáticas dessas plantas devem ser retiradas e submetidas à extração do DNA (SAGHAIMAROOF et al., 1984) e ao teste de PCR multiplex (OLIVEIRA et al., 2005), utilizando-se condições de reação descritas por Lee et al. (1993) e os oligonucleotídeos R16F2: 5'-ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG-3' e R16R2: 5'-TGA CGG GCG GTG GTA CAA ACC CCG-3' (LEE et al., 1993) para identificação do fitoplasma e os oligonucleotídeos CSS-F2 (5'-GGC AAA AGA TGT AAC AAA AGT-3') e CSSR6 (5'-GTT ACT TCA ACA GTA GTT GCG-3') (BARROS et al., 2001) para identificação de espiroplasma. No caso das plantas com sintomas de infecção por MRFV, pode-se extrair o RNA total (LANE, 1986) de amostras de folhas e, utilizando-se o método descrito por De Vries et al. (1982), realizar análises RT-PCR (HAMMOND et al., 1997; ALMEIDA et al., 2000), utilizando-se os oligonucleotídeos MRFV-09 (5' CCT CTT CCT GAT CCT CCT CGT GTG CTG GAG ACG 3') e MRFV-10 (5' GCC CAC AGG TCT TAT GGC CGA CCT GCT ACC 3') (HAMMOND et al., 1997).

Aquisição dos fitopatógenos no campo

Após a identificação das plantas de milho infectadas isoladamente por fitoplasma, por espiroplasma e por MRFV, no campo, as folhas da parte superior dessas plantas devem ser envolvidas por um saco de confinamento (Figura 8), sendo a base desse saco amarrada firmemente ao colmo. Por meio do orifício no saco de confinamento, ninfas de segundo ou de terceiro instar de *D. maidis*, sadias, devem ser colocadas para se alimentarem nessas plantas, utilizando-se aspirador bucal (Figura 4), sendo esse orifício fechado com “velcro”. A quantidade de ninfas a ser colocada vai depender do tamanho e do vigor da planta em questão; preferencialmente deve-se colocar entre 1.000 e 2.000 ninfas por planta. Nessas plantas, as ninfas devem permanecer se alimentando por um PAA de aproximadamente 96 horas. Ninfas de segundo ou de terceiro instar podem ser obtidas colocando-se cerca de 300 adultos, provenientes da colônia sadia, sobre plantas de milho aos 15 a 20 dias após a emergência, em gaiola de criação (Figura 6), utilizando-se de dois a quatro vasos pequenos (Figura 10A) com três plantas em cada. Os insetos devem permanecer por 2 a 3 dias sobre as plantas. Posteriormente, as plantas devem ser retiradas e colocadas em uma nova gaiola de criação, obtendo-se as ninfas para a aquisição após cerca de 14 a 16 dias.

Estabelecimento de colônias de cigarrinhas infectantes

Findo o PAA, as plantas do campo devem ser cortadas, transportadas para o laboratório e cada lote de ninfas que se alimentou nas plantas contendo os fitopatógenos, fitoplasma, espiroplasma e MRFV deve ser transferido, separadamente, utilizando-se a caixa de transferência (Figura 5), para gaiolas de

criação (Figura 6). Nessas gaiolas permanecerão sobre plântulas de milho saudias por 28 a 30 dias, correspondente ao período latente, ou período necessário para que os fitopatógenos se multipliquem em *D. maidis*. Então, já como adultos, as cigarrinhas se encontrarão infectantes e aptas a transmitir os fitopatógenos.

Obtenção de plantas-fonte dos fitopatógenos

Para a obtenção de plantas-fonte, deve-se oferecer para cada uma das colônias contendo as cigarrinhas infectantes, plantas de milho saudias, com cerca de sete a dez dias após a emergência, cultivadas em vasos pequenos (Figuras 10A e B), numa proporção igual ou superior a cinco cigarrinhas por planta. As plantas submetidas à transmissão devem permanecer nas gaiolas por um PAI de aproximadamente 96 horas. Deve-se utilizar preferencialmente plantas de milho suscetíveis, por exemplo, milho-pipoca. Após o PAI, as plantas submetidas à inoculação devem ser transplantadas individualmente para vasos maiores (Figuras 10C e 10D), adubadas de acordo com recomendação técnica e pulverizadas com inseticida para se eliminar ninfas que eventualmente eclodam. Deve-se utilizar um inseticida com residual curto (piretroide), pois essas plantas posteriormente serão utilizadas como fonte dos fitopatógenos, sendo submetidas à aquisição por cigarrinhas saudias.

Manutenção das colônias de cigarrinhas infectantes e das plantas-fonte

As colônias de cigarrinhas infectantes devem ser mantidas em gaiolas de criação (Figura 6), oferecendo-se plantas de milho saudias. Cada uma das colônias portadoras de fitoplasma, espiroplasma e MRFV, juntamente com o lote de plantas-fonte

contendo o mesmo fitopatógeno, devem ser mantidos separadamente em viveiros telados (Figura 1), para se evitar uma eventual contaminação entre os fitopatógenos. Os processos de aquisição e de transmissão para se obter colônias infectantes e plantas-fonte, descritos acima, devem ser contínuos (Figura 13), visando ter, a qualquer momento, material biológico para ser utilizado em bioensaios.

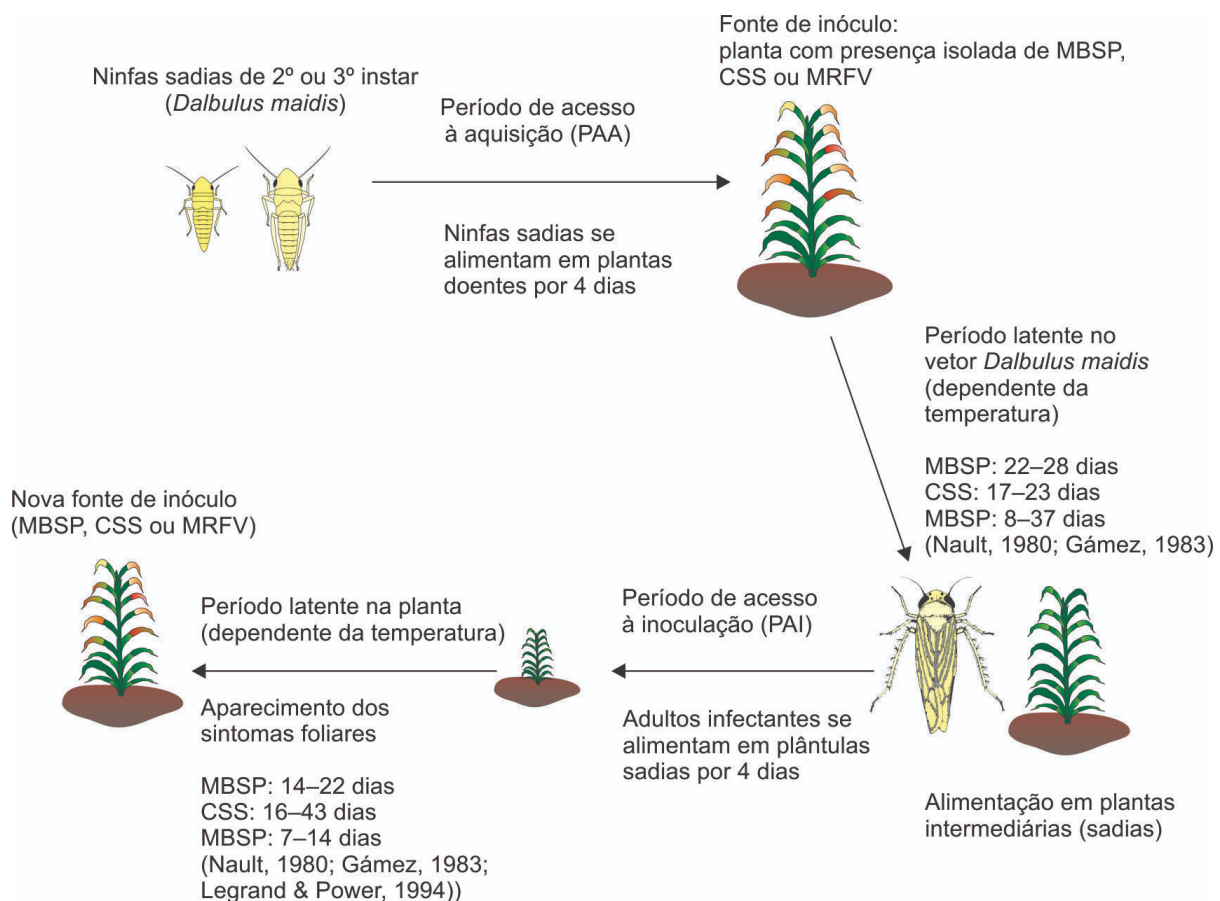


Figura 13. Esquema para obtenção e manutenção de isolados de fitoplasma (*Maize bushy stunt phytoplasma* – MBSP), espiroplasma (*Corn stunt spiroplasma* – CSS) ou *Maize rayado fino marafivirus* (MRFV).

Ilustração: Wellington Cavalcanti

Bioensaios de transmissão dos mollicutes e vírus

Para estudos de transmissão, é necessário um planejamento prévio para que haja uma sincronia entre disponibilidade de cigarrinhas infectantes, aptas a transmitir os fitopatógenos, e de plantas de milho na idade e condições desejadas, de acordo com a finalidade do estudo. Em linhas gerais, as etapas requeridas para tais estudos são:

Inoculações de mollicutes e de vírus em plantas de milho, em viveiro telado ou em casa de vegetação

Para obtenção de ninfas sadias e posterior obtenção de cigarrinhas infectantes, deve-se seguir os procedimentos descritos anteriormente.

Plantio do milho

A data do plantio do milho, que será alvo das inoculações deverá ser calculada com base no final do período latente no vetor e de acordo com a idade que se deseja que as plantas tenham por ocasião das inoculações, o que estará em função da cultivar ou variedade de milho utilizada, época do ano, turno de rega, entre outros. De modo geral, o tempo entre o plantio e a germinação é de cinco a sete dias e na maioria dos bioensaios as plantas são submetidas à inoculação com idade entre dois e dez dias após a emergência, uma vez que, para esses fitopatógenos, inoculações precoces causam maior severidade de sintomas nas plantas (HRUSKA; PERALTA, 1997; MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; FERNANDES; OLIVEIRA, 2000). Assim, recomenda-se o plantio do milho entre 7 e 17 dias antes do final do período latente no vetor.

Inoculações

Sobre as plantas de milho a serem inoculadas, devem ser colocadas as gaiolas de confinamento (Figura 7). As cigarrinhas a serem utilizadas no bioensaio de transmissão devem ser soltas na caixa de manipulação (Figura 5) e então recolhidas com aspirador bucal (Figura 4). Deve-se retirar a tampa da gaiola de confinamento e as cigarrinhas que estão no aspirador devem ser expelidas para o interior da gaiola, sendo as tampas imediatamente recolocadas. As cigarrinhas permanecerão por um PAI de aproximadamente 96 horas, após o qual as gaiolas devem ser retiradas e as cigarrinhas recolhidas com aspirador bucal (Figura 6). O número de cigarrinhas por planta, a ser utilizado, dependerá da finalidade do bioensaio. Alguns estudos têm demonstrado que uma única cigarrinha é capaz de transmitir de forma eficiente os fitopatógenos (OLIVEIRA et al., 2001); no entanto, recomenda-se a utilização de três a cinco cigarrinhas por planta, diminuindo-se a possibilidade de não haver transmissão pela morte dos insetos durante o PAI ou de alguns insetos não se tornarem infectantes. As plantas a serem inoculadas podem estar em vasos pequenos, e, nesse caso, a gaiola de confinamento pode ser presa ao vaso com fita adesiva. As inoculações podem ser feitas em laboratório e, após o PAI e a eliminação das cigarrinhas, as plantas podem ser levadas para o viveiro e serem transplantadas para vasos maiores (Figuras 10C e 10D). No caso de as plantas estarem em vasos maiores, as inoculações podem ser feitas no viveiro (Figura 2), transportando-se as cigarrinhas em aspiradores bucais, como descrito no item *Transporte das cigarrinhas infectantes para o campo*.

Avaliações

As avaliações a serem realizadas dependerão da finalidade do bioensaio. Comumente realizam-se avaliações de sintomas foliares,

registrando-se sintomas de avermelhamento, amarelecimento, estrias esbranquiçadas e seca foliar, utilizando-se escala de notas de quatro níveis: 0, ausência de sintomas, 1, baixa severidade (plantas com apenas uma folha com sintomas), 2, média severidade (plantas com aproximadamente 50% das folhas com sintomas) e 3, alta severidade (planta inteira com sintomas ou início de morte precoce). Essas avaliações podem ser realizadas aos 30, 60 e 100 dias. Além dos sintomas foliares, é possível registrar as seguintes variáveis: altura das plantas, número de perfilhos basais e axilares, peso fresco e peso seco da planta, número e peso de espigas, peso fresco e peso seco de grãos, peso seco de 1.000 grãos, número de grãos por fileira na espiga, tamanho de grãos, dentre outras. Para a confirmação da presença dos fitopatógenos nas plantas submetidas às inoculações, deve-se coletar a folha bandeira (primeira folha abaixo do pendão) das plantas, por volta de 80 ou 90 dias após o PAI, e submetê-las ao teste de PCR multiplex, para detecção de fitoplasma e de espiroplasma, e ao RT-PCR para detecção de MRFV, como descrito anteriormente.

Inoculação de mollicutes e de vírus em plantas de milho, em campo

Inoculações de mollicutes e de vírus em milho, no campo, por meio de cigarrinhas, requerem alguns cuidados e etapas especiais em relação àquelas realizadas em laboratório e viveiros, principalmente pela maior dificuldade de controle de fatores externos que possam afetar os resultados do estudo. A seguir são discutidas as principais etapas para esse tipo de inoculação.

Obtenção de cigarrinhas infectantes

Em estudos de campo geralmente se trabalha com número maior de plantas do que em viveiro ou laboratório. Assim sendo, há a necessidade de se ter grandes populações de cigarrinhas sadias para se obter, conseqüentemente, grande número de espécimes infectantes com os fitopatógenos, fitoplasma, espiroplasma ou MRFV, para inoculações. Por exemplo, para a inoculação de um desses fitopatógenos em 500 plantas de milho, no campo, utilizando-se entre três e cinco cigarrinhas por planta, necessita-se de 1.500 a 2.500 cigarrinhas infectantes. Assim, na etapa de obtenção de ninfas sadias para a aquisição do fitopatógeno, deve-se ter pelo menos três gaiolas de criação (Figura 6), cada uma com 300 a 500 adultos de *D. maidis*, realizando postura. Isso garantirá a obtenção de grande quantidade de ninfas, superior a 2.500 indivíduos necessários, já que durante o PAA, e o período latente, há mortalidade de indivíduos. Para a aquisição dos fitopatógenos, deve-se distribuir as ninfas sadias em diversas plantas-fonte, visando evitar que populações muito altas de ninfas sobre uma única planta-fonte possam causar a morte dela, antes de se completar o PAA.

Transporte de cigarrinhas infectantes para o campo

Para as inoculações em campo há a necessidade de manipulação das cigarrinhas em laboratório e do seu transporte para o local da inoculação. Para isso, as cigarrinhas devem ser acondicionadas em pequenos tubos de plástico transparentes, em grupos de três a cinco, sendo o número de tubos correspondente ao número de plantas a serem submetidas à inoculação, no campo. Esses tubos devem ser compatíveis com os tubos utilizados nos aspiradores bucais (Figura 4). Assim, as cigarrinhas infectantes, soltas na caixa de manipulação (Figura 5), podem ser aspiradas para o interior tubo

que, posteriormente, é desconectado da mangueira e tem as suas extremidades fechadas com pequenas rolhas. Esses tubos são transportados para o campo e lá são novamente encaixados na mangueira do aspirador bucal e as cigarrinhas são expelidas para o interior das gaiolas de confinamento (Figura 7). Como tubos de plástico, pode ser utilizado o corpo transparente de canetas esferográficas ou ponteiros de plástico transparente (5.000 μL) de micropipetas.

Inoculação nas plantas

Nesse tipo de estudo é necessário que, após o plantio do milho que será submetido à inoculação, no campo, haja inspeção periódica da área plantada, para que, ao primeiro sinal da emergência das plantas sejam colocadas sobre elas as gaiolas de confinamento (Figura 7). Isso evita que cigarrinhas do campo, que podem estar infectantes, venham a se alimentar dessas plantas antes da inoculação. As cigarrinhas utilizadas para a inoculação devem permanecer se alimentando nas plantas por um PAI de aproximadamente 96 horas. Findo esse período, os insetos devem ser mortos utilizando-se inseticida, dirigindo-se o jato de pulverização para dentro das gaiolas de confinamento. Para esse fim, deve-se usar inseticida com residual curto, para que as gaiolas de confinamento possam ser novamente utilizadas em outros bioensaios, em curto espaço de tempo, sem o perigo de conter resíduo de inseticida. Após o PAI, deve-se retirar as gaiolas de confinamento e iniciar pulverizações semanais sobre as plantas, com inseticida de residual longo, para se evitar a reinoculação das plantas por cigarrinhas infectantes, naturalmente presentes no campo.

Outra técnica que pode ser empregada para estudos em campo é a inoculação dos fitopatógenos em plântulas de milho, em laboratório, e posterior transplante dessas plântulas para o campo. Nessa técnica o milho é plantado em pequenos potes de plástico (Figura 10 A) e submetido à inoculação logo após a emergência, conforme descrito anteriormente. Após o PAI, as cigarrinhas são retiradas, as plantas são levadas para o campo e plantadas em covas. Também nesse caso, as plantas são pulverizadas semanalmente para evitar a reinoculação por cigarrinhas infectantes presentes no campo, e as avaliações e diagnose são realizadas conforme descrito anteriormente. As vantagens desta técnica, em relação à inoculação desses fitopatógenos diretamente no campo, são: menor utilização de mão de obra, uma vez que todo processo pode ser realizado em laboratório; menor estresse do vetor, que não precisa ser transportado a longas distâncias, em recipientes especiais e de dimensões reduzidas; maior número de plantas que podem ser submetidas à inoculação no mesmo espaço de tempo; possibilidade de verificação da taxa de mortalidade do vetor durante o PAI, e imediata reinoculação; condução da inoculação em condições controladas e menor probabilidade de interferência de condições climáticas adversas (vento, chuva).

Avaliações

As mesmas avaliações sugeridas para os experimentos em viveiro telado, ou em casa de vegetação, podem ser feitas nos experimentos em campo.

Técnicas para estudos com parasitoides de ovos de *D. maidis*

Para os estudos com parasitoides de ovos de *D. maidis*, inicialmente, é necessário o estabelecimento e a manutenção de uma colônia de cigarrinhas conforme já mencionado neste capítulo.

Plantas sentinelas

Vasos pequenos, contendo de 3 a 4 plantas de milho, com aproximadamente 10 dias, após a emergência, são produzidos em viveiro telado. Posteriormente, sobre esses vasos são encaixadas gaiolas constituídas por duas garrafas do tipo PET, das quais são retirados o fundo e a parte superior, encaixando-se as duas secções, formando um tubo com cerca de 30 cm de altura e 10 cm de diâmetro. Na parte superior do tubo é colocado tecido “voil” para permitir ventilação, e o mesmo tecido é utilizado em aberturas na parte lateral da gaiola (Figura 14). Após a colocação das gaiolas sobre as plantas de milho são liberadas, por meio de aspirador bucal, de 10 a 15 fêmeas adultas de *D. maidis*, por planta.



Figura 14. Gaiolas utilizadas para estudos com parasitoides de ovos de *D. maidis*.

Foto: Ranyse Barbosa Querino

As gaiolas contendo as cigarrinhas e as plantas são mantidas durante 3 dias em câmara climatizada (BOD) com temperatura de 27 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa de cerca de 60% ± 10%, para a oviposição. Esse período curto de tempo permite que se obtenham posturas no início do período embrionário,

aumentando a taxa de parasitismo dos ovos. Após esse período, os vasos com as plantas contendo ovos de *D. maidis* são retirados e levados para o campo. Nas bordas de uma área de milho, cerca de 20 vasos são colocados em suporte metálico a uma altura de aproximadamente 50 cm do solo e permanecem expostos aos parasitoides por um período de cinco dias.

Obtenção dos parasitoides em laboratório

Após o período de acesso à oviposição dos parasitoides em campo, os vasos contendo as plantas de milho são transportados para o laboratório. As plantas devem ser retiradas dos vasos e higienizadas com hipoclorito de sódio a 1%. Após a higienização e secagem das folhas contendo os ovos de *D. maidis*, essas folhas são acondicionadas em tubos de ensaio transparentes, cuja parte superior deve ser fechada com filme plástico. Os tubos de ensaios devem ser mantidos em câmaras climatizadas (27 °C, fotofase de 12 horas e UR de 60% ± 10%). Diariamente os tubos de ensaios devem ser inspecionados ao microscópio estereoscópico, para verificação da emergência de parasitoides.

Armazenamento e identificação dos parasitoides

Os parasitoides recuperados nos tubos de ensaio devem ser armazenados em frascos de microcentrífuga (“Eppendorf”), contendo álcool 80% para conservação, e identificados quanto ao local e data da coleta. Posteriormente, os parasitoides devem ser examinados em microscópio estereoscópico para triagem inicial em morfotipos, e posterior identificação taxonômica específica.

Visando obter dados do complexo de parasitoides de *D. maidis* é importante que o levantamento seja feito, preferencialmente, durante todo o ano, semanalmente ou quinzenalmente.

Principais problemas com a criação de *D. maidis*

Durante a manutenção de *D. maidis*, em gaiolas de criação (Figura 6), em viveiro telado (Figura 1) ou em casa de vegetação, alguns problemas podem comprometer de forma imediata experimentos previamente programados, ou mesmo toda a rotina de criação desse inseto-vetor. Os principais problemas possíveis são: ataque de formigas predadoras, contaminação das colônias de cigarrinhas por pulgões, ou mesmo por moscas-branca, e por ácaros, e contaminação das cigarrinhas por fungos entomopatogênicos.

As formigas predadoras invadem as colônias de cigarrinhas e carregam os indivíduos, principalmente as ninfas. Algumas vezes podemos observar esses insetos atacando e carregando adultos de *D. maidis*. Por se tratar de insetos rasteiros, uma medida que pode ser tomada é a adaptação de “pés” nas gaiolas de criação, os quais são colocados dentro de pequenas vasilhas contendo água e espalhante adesivo, uma vez que algumas espécies de formigas podem caminhar sobre a água, utilizando para isso a tensão superficial do líquido. Outra possibilidade é aplicação de cola pastosa nos “pés” das gaiolas ou mesmo nos “pés” das estantes ou bancadas onde se encontram as gaiolas de criação. É importante a inspeção periódica das gaiolas, observando-se sempre se não estão encostadas em local que sirva de ponte para as formigas.

Pulgões, principalmente as espécies *Rhopalosiphum maidis* (Fitch.) e *R. padi* (L.), podem, mesmo tomando-se todas as precauções, invadir o viveiro onde se mantêm as plantas utilizadas para a alimentação das cigarrinhas, e posteriormente serem levados para as gaiolas de criação. Esses insetos têm um alto potencial biótico e podem, em pouco tempo, atingir alta população e, por competição, causar o declínio nas populações de cigarrinhas. No caso de contaminação inicial, em que a população dos pulgões ainda é pequena, podemos cuidadosamente liberar os insetos dessa gaiola contaminada, recolher apenas as cigarrinhas *D. maidis* e passá-las para uma gaiola limpa, com plantas de milho isentas de pulgões. Posteriormente, eliminam-se as plantas contaminadas com os pulgões e lavam-se cuidadosamente as gaiolas. Os procedimentos para o controle de mosca-branca e de ácaros são semelhantes aos adotados para os pulgões.

Em regiões muito quentes, especialmente no período chuvoso, quando a umidade relativa do ar é muito alta, há possibilidade do aparecimento de fungos entomopatogênicos sobre as cigarrinhas, principalmente os do gênero *Beauveria*. Esses fungos parecem infectar as cigarrinhas ainda quando ninfas, as quais, apesar da infecção, aparentam ter desenvolvimento normal, atingindo o estágio adulto. Nesta fase, os insetos mostram perda de mobilidade, tornam-se letárgicos e morrem. Após a morte, ocorre a esporulação do fungo, dando às cigarrinhas um aspecto cotonoso, branco-aveludado. Em pouco tempo, uma gaiola contendo cigarrinhas infectadas pelo fungo pode ser totalmente dizimada. Infelizmente, nenhum fungicida foi testado para o controle desse fungo em gaiolas de criação, mesmo porque, fora desse contexto, esses fungos são importantes agentes de controle biológico. Medidas profiláticas podem ser tomadas, como redução do número de

plantas por gaiola, redução na quantidade e periodicidade de rega das plantas nas gaiolas e lavagem das gaiolas de criação em uma solução de hipoclorito de sódio.

Atenção especial deve ser dada à escolha das sementes de milho para obtenção de plântulas utilizadas na criação das cigarrinhas e nos bioensaios de transmissão. Por não haver, até onde se sabe, preferência de *D. maidis* por esse ou aquele genótipo de milho, pode-se utilizar qualquer material genético, desde que seja suscetível aos fitopatógenos em estudo e mostre sintomas indicativos da infecção por eles. Considerando-se que muitas dessas sementes são tratadas com fungicidas e inseticidas para a sua comercialização, deve-se certificar de que o lote a ser utilizado nos estudos recebeu tratamento apenas com fungicida.

Considerações finais

O número de pesquisadores que se dedicam ao estudo de insetos-vetores de fitopatógenos, no Brasil, é relativamente pequeno. Em contrapartida, os prejuízos econômicos ocasionados por esses vetores, nas mais diversas culturas, são notáveis. Neste capítulo, buscou-se transmitir a experiência dos autores em estudos com *D. maidis* e demonstrar que as técnicas para a criação desse inseto, para estudos de transmissão dos fitopatógenos, e outros estudos, como a avaliação do complexo de inimigos naturais, são relativamente simples, podendo ser facilmente adaptadas para outras espécies de vetores. Assim, espera-se contribuir e incentivar estudos na área de transmissão de fitopatógenos por insetos, ramo da Entomologia tão carente de profissionais no País.

Referências

- ALMEIDA, A. C. L.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O. Detecção de vírus por RT-PCR, hibridização 'dot-blot' e dot-ELISA em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 168-174, 2000.
- ALIVIZATOS, A. S.; MARKHAM, P. G. Acquisition and transmission of corn stunt spiroplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals of Applied Biology**, v. 108, p. 535-544, 1986.
- BARROS, T. S. L.; DAVIS, R. E.; RESENDE, R. O.; DALLY, E. L. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. **Plant Disease**, v. 85, n. 5, p. 475-480, 2001.
- DE VRIES, S. C.; SPRINGER, J.; WESSELS, J. G. H. Diversity of abundant mRNA sequences and patterns of proteins synthesis in etiolated and greened pea seedlings. **Planta**, v. 156, p. 129-135, 1982.
- FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. de. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 2000. 80 p. (Embrapa-CNPMS. Circular técnica, 26).
- FUKUSHI, T. Relationships between propagative rice virus and their vectors. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Viruses, vectors and vegetation**. New York: Interscience, 1969.p. 279-301.
- GONZALES, V.; GÁMEZ, R. Algunos factores que afectan la transmisión del virus del rayado fino del maíz por *Dalbulus maidis* DeLong& Wolcott. **Turrialba**, v. 24, n. 1, p. 51-57, 1974.
- HAMMOND, R. W.; KOGEL, R.; RAMIREZ, P. Variability of geographically distinct isolates of maize rayado fino virus in Latin America. **Journal of General Virology**, v. 78,p. 3153-3159, 1997.
- HRUSKA, A. J.; PERALTA, M. G. Maize response to corn-leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) infestation and achaparramiento disease. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, p. 604-610, 1997.
- LANE, L. C. Propagation and purification of RNA plant viruses. **Methods in Enzymology**, v. 20, p. 687-696, 1986.
- LEE, I. M.; HAMMONS, R. W.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN, D. E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S r DNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, v. 83, n. 8,p. 834-842, 1993.
- LEGRAND, A. I.; POWER, A. G. Inoculation and acquisition of maize bushy stunt mycoplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals of Applied Biology**, v. 125,p. 115-122, 1994.

MARÍN, R. Biología y comportamiento de *Dalbulus maidis* (Homoptera-Cicadellidae). **Revista Peruana de Entomología**, v. 30, p. 113-117, 1987.

MARKHAM, P. G.; ALIVIZATOS, A. S. The transmission of corn stunt spiroplasma by natural and experimental vectors. In: INTERNATIONAL MAIZE VIRUS DISEASE COLLOQUIUM AND WORKSHOP, 1982, Wooster, Ohio. **Proceedings...** Wooster: The Ohio State University: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1983. p. 56-61.

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**, v. 24, n. 2, p. 136-142, 1999.

MENEZES, M. **Contribuição ao estudo da subfamília Deltocephalinae (Homoptera: Cicadellidae) no Estado de São Paulo**. 1972. 146 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

NAULT, L. R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 90, n. 5, p. 521-541, 1997.

NAULT, L. R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica**, v. 35, n. 2, p. 165-175, 1990.

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

OLIVEIRA, C. M. **Variação morfológica entre populações de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae) de algumas localidades do Brasil**. 1996. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; DIAS, C. T. S.; NAULT, L. R. Influence of latitude and elevation on polymorphism among populations of the corn-leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. **Environmental Entomology**, v. 33, p. 1192-1199, 2004.

OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E.; CANUTO, M.; CRUZ, I. Controle químico da cigarrinha-do-milho e incidência dos enfezamentos causados por mollicutes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 297-303, 2007.

OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E.; CRUZ, I. Efeito de diferentes densidades do vetor *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) na severidade de doenças causadas por fitoplasma e por *Spiroplasma kunkelii* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 509, 2001. Suplemento. Edição do 34º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, 2001.

OLIVEIRA, E.; CARVALHO, R. V.; DUARTE, A. P.; ANDRADE, R. A.; RESENDE, R. O.; OLIVEIRA, C. M.; RECCO, P. C. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho Sorgo**, v. 1, n. 1, p. 38-46, 2002a.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M.; MAGALHÃES, P. C.; ANDRADE, C. L. T.; HOGENHOUT, A. S. Spiroplasma and phytoplasma infection reduce kernel production, and nutrients and

water contents of several but not all maize cultivars. **Maydica**, v. 50, n. 2, p. 171-178, 2005.

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

OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E.; SOUZA, I. R. P.; ALVES, E.; DOLEZAL, W.; PARADELL, S.; REMEZ-LENICOV, A. M. M.; FRIZZAS, M. R. Abundance and species richness of leafhoppers and planthoppers (Hemiptera: Cicadellidae and Delphacidae) in Brazilian maize crops. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 4, p. 1470-1481, 2013.

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O.; GIMÉNEZ PECCI, M. L. P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Ocorrência e perdas causadas por mollicutes e vírus na cultura do milho safrinha no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 19-25, 2003.

PANIAGUA, R.; GÁMEZ, R. El virus del rayado fino del maíz: estudios adicionales sobre la relación del virus y su insecto vector. **Turrialba**, v. 26, n. 1, p. 39-43, 1976.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley, Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

STRONG, D. R.; LAWTON, J. H.; SOUTHWOOD, R. **Insects on plants: community patterns and mechanisms**. Cambridge: Harvard University Press, 1984. 313 p.

TODD, J. L.; MADDEN, L. V.; NAULT, L. R. Comparative growth and spatial distribution of *Dalbulus* leafhoppers populations (Homoptera: Cicadellidae) in relation to maize phenology. **Environmental Entomology**, v. 20, n. 2, p. 556-564, 1991.

TRIPLEHORN, B. W.; NAULT, L. R. Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the Macrostelini. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, n. 3, p. 291-315, 1985.

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

WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; CRUZ, I.; SANTOS, J. P. Aspectos da biologia da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 28, n. 3, p. 413-420, 1999.

Capítulo 11

Resistência do milho aos enfesamentos causados por molicutes

Flavia França Teixeira | Elizabeth de Oliveira Sabato



Os enfesamentos e o milho safrinha

A produtividade do milho pode ser afetada por várias enfermidades, dentre elas, os enfesamentos. Os relatos de prejuízos na cultura do milho devido à incidência de enfesamentos tornaram-se mais frequentes e crescentes a partir da década de 1990, especialmente

nas áreas onde se cultiva o milho safrinha (OLIVEIRA et al., 2002a, 2003, 2009).

Tendo em vista a relação entre a safrinha (segunda safra) e os prejuízos causados pelos enfezamentos, é importante considerar o enorme crescimento da safrinha, no Brasil. Segundo dados do IBGE (2015), na última década a área plantada com milho safrinha passou de 2,97 para 9,00 milhões de ha, e esse aumento na área plantada, levou ao aumento de produção de 38,92 milhões de toneladas de grãos entre 2005 e 2014. Percentualmente, a área plantada na safrinha correspondia, em 2005, a 25,71% da área plantada com milho no Brasil e a 15,90% da produção total de milho. Em 2012, a área cultivada com a safrinha passou a ser maior do que a área dedicada à primeira safra e, em 2014, a área cultivada com a safrinha foi 59,09% da área total cultivada com milho, o que correspondeu a 60,42% da produção nacional. Esses resultados indicam, não apenas o aumento da área, mas também o aumento da produtividade da safrinha (Tabela 1).

Tabela 1. Evolução da área colhida, produção e produtividade de milho na primeira e segunda safras brasileira entre 2005 e 2014.

Ano	Área colhida (milhões de ha)		Produção de grãos (milhões de t)		Produtividade (t/ha)	
	Primeira safra	Segunda safra	Primeira safra	Segunda safra	Primeira safra	Segunda safra
2005	8,58	2,97	27,16	7,95	3,16	2,68
2006	9,28	3,33	31,48	11,17	3,39	3,35
2007	9,68	4,08	37,66	14,45	3,89	3,54
2008	9,42	5,02	39,83	19,10	4,23	3,80
2009	8,51	4,38	30,71	16,37	3,61	3,74
2010	6,86	5,04	29,85	21,57	4,35	4,28
2011	7,51	5,71	33,49	22,17	4,46	3,88
2012	6,89	7,30	32,82	38,25	4,76	5,24
2013	6,39	8,93	34,16	46,38	5,35	5,19
2014	6,23	9,00	30,70	46,87	4,93	5,20

Fonte: IBGE (2015).

Segundo dados do IBGE, se forem consideradas as diferentes regiões brasileiras, é possível notar que a safrinha já é cultivada em todas as regiões. Na região Norte, a safrinha passou a ser cultivada em 2008 e ocupa área muito pequena. Nas regiões Nordeste e Sudeste, as áreas com safrinha são menores do que a área cultivada com a primeira safra e se mantêm constante. Já na região Sul a área com a safrinha vem se tornando maior e a área ocupada com a primeira safra que vem sendo reduzida. A região Centro-Oeste é onde a safrinha tem mostrado os maiores aumentos. Entre 2005 e 2012, houve um acréscimo de 3,07 milhões de ha com o milho safrinha nessa região, o que levou ao aumento de 21 milhões de toneladas de grãos de milho produzidos. Em 2012, a produção

de milho safrinha dessa correspondeu a 36,19% da produção nacional, entretanto, o milho é relativamente pouco cultivado na primeira safra na região Centro-Oeste.

Esses dados ilustram a necessidade da regionalização dos programas de melhoramento de milho, uma vez que, além de fatores ambientais, a sucessão da cultura do milho está presente em todas as regiões brasileiras. Os crescentes prejuízos causados por enfezamentos se devem à sucessão dos cultivos de milho, proporcionando maior permanência das plantas no campo, servindo para alimentação e reprodução do vetor dos agentes causais dos enfezamentos a cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) (OLIVEIRA et al., 2002b). As mudanças climáticas poderão levar ao agravamento dos prejuízos causados pelos enfezamentos, pois são esperados aumentos dos enfezamentos em regiões onde a temperatura média for mais alta (OLIVEIRA et al., 2009).

Os enfezamentos são causados por mollicutes, e divididos em: enfezamento pálido e enfezamento vermelho de acordo com o agente causal, *Spiroplasma kunkelli* e fitoplasma, respectivamente. Os sintomas típicos do enfezamento pálido são estrias esbranquiçadas nas folhas a partir da base, crescimento reduzido, plantas com amarelecimento generalizado, algum avermelhamento nas folhas apicais, e seca precoce e atípica de plantas. O enfezamento vermelho tem como sintomas o avermelhamento generalizado da planta, proliferação de espigas, perfilhamento na base da planta ou nas axilas foliares e seca precoce das plantas (OLIVEIRA et al., 2013). O controle dos enfezamentos pode ser feito por meio do controle do inseto-vetor, técnicas de manejo que evitem

o cultivo sucessivo, ou por meio do uso de cultivares resistentes, que é a forma de controle mais efetiva.

Para a obtenção de cultivares de milho, resistentes aos enfezamentos, há necessidade de informações sobre o controle genético da resistência a ambos os patógenos, de identificação de fontes de resistência, e ainda, de desenvolvimento de genótipos que associem a resistência aos enfezamentos à produtividade e à adaptação às condições de cultivo. O objetivo do presente capítulo é rever esses tópicos.

Resistência genética de plantas a patógenos

A principal forma de controle aos estresses bióticos é a resistência genética de plantas. A resistência aos patógenos pode ser qualitativa, ou seja, resulta em classes distintas de plantas que são classificadas como “resistentes” ou “suscetíveis”; ou quantitativa, quando a reação ao patógeno apresenta variação contínua para expressão fenotípica de diferentes genótipos (FEHR, 1987).

A resistência qualitativa, também denominada de resistência vertical ou resistência específica, é de herança monogênica ou oligogênica. Esse tipo de resistência também se caracteriza por ser mais vulnerável a novas raças de patógenos. Uma cultivar com alelos que conferem resistência vertical, quando exposta a populações de patógenos, pode levar à seleção de raças para as quais não apresenta resistência. O uso contínuo dessa cultivar leva ao predomínio das raças selecionadas e, assim, ocorre a “quebra” da resistência, o que resulta em prejuízos. Uma forma de minimizar

esse problema é a piramidização de alelos de resistência (FEHR, 1987).

A resistência quantitativa, também denominada resistência horizontal ou resistência geral, é obtida pela contribuição de diversos alelos presentes em muitos genes de efeito menor. A principal vantagem dessa forma de resistência é que ela pode ser efetiva para um maior número de raças e assim, mais duradoura. Por outro lado, a desvantagem da resistência horizontal é que a transferência de alelos que conferem a resistência horizontal de um genótipo para outro é mais difícil em relação à transferência de alelos que conferem resistência vertical (FEHR, 1987).

O desenvolvimento de cultivares resistentes é uma atividade complexa, uma vez que, envolve, não apenas a variabilidade genética das plantas e dos patógenos, mas também a interação entre o patógeno e o hospedeiro, que pode ainda interagir com o ambiente. Por essa razão, os resultados das avaliações das reações dos genótipos devem ser interpretados com cautela (BUENO et al., 2001).

Tendo em vista a complexidade do desenvolvimento de cultivares resistentes a patógenos, alguns itens devem ser considerados em programa de melhoramento com esse objetivo. Segundo Borém (1997), os seguintes itens devem ser avaliados no planejamento das atividades: danos econômicos causados pela doença, fontes de resistência, complexidade da herança da resistência, mérito agrícola da fonte de resistência, facilidade de manipulação do patógeno, perspectiva da durabilidade da resistência e frequência, prevalência e distribuição de raças fisiológicas na região.

A informação sobre a interação alélica de genes maiores que conferem a resistência aos patógenos torna-se fundamental para o melhoramento, uma vez que o milho é uma planta alógama e também pela participação de milho híbrido no mercado brasileiro de sementes. Se o alelo que confere a resistência for dominante, ele poderá estar presente em apenas uma das linhagens genitoras de um híbrido-simples resistente. Entretanto, se o alelo que confere a resistência for recessivo, ou se, a herança for tipo aditiva, o alelo que confere a resistência deverá estar presente em ambos os genitores de um híbrido simples resistente.

Alelos que conferem as resistências vertical e horizontal podem estar estejam presentes em um só indivíduo. Nesses casos, a expressão dos alelos que conferem a resistência horizontal pode ser mascarada pelos alelos que conferem a resistência vertical o que dificulta a avaliação dos efeitos da resistência horizontal.

No melhoramento de milho, é importante a definição do tipo de cultivar, ou seja, se o programa visa obter híbridos ou variedades. No caso de variedades, o desenvolvimento de sintéticos que reúnam diversas fontes de resistência vertical é uma opção que pode levar a maior durabilidade da resistência. No caso de programas cujos objetivos sejam híbridos, a avaliação preliminar de linhagens é favorável para a seleção de genótipos superiores, entretanto a avaliação de híbridos também se faz necessária.

O uso de marcadores moleculares auxilia em programas que empregam o método de retrocruzamento, tanto na seleção do alelo a ser transferido quando na recuperação de genótipo do pai recorrente (BORÉM, 1997).

Controle genético da resistência do milho aos mollicutes

Alguns estudos já foram realizados visando compreender o controle genético da resistência do milho aos enfezamentos. É importante considerar que os enfezamentos podem ser causados por no mínimo dois agentes causais e que a infecção envolve, além da planta e do patógeno, o vetor e, ainda, que há forte influência ambiental. Desta forma, estudos sobre o controle da resistência podem ser conduzidos em uma ampla gama de condições e, por essa razão, levarem a resultados que se somam para elucidar os mecanismos genéticos para resistência, porém, individualmente, não são estudos conclusivos.

Um dos primeiros aspectos a serem considerados na avaliação de resistência a plantas a patógenos é a identificação do agente causal. A maioria dos estudos sobre a resistência do milho aos enfezamentos, considera como o agente causal o complexo dos enfezamentos, o que possivelmente envolve a presença do espiroplasma e do fitoplasma, em proporções variáveis. Entretanto, a predominância dos patógenos, assim como a severidade dos efeitos de cada agente causal não é constante. A prevalência dos agentes causais do complexo dos enfezamentos, assim como a severidade foram considerados, em alguns estudos. Diferentes genótipos foram usados por Oliveira et al. (2002b) para observar a predominância da infecção por espiroplasma em relação ao fitoplasma e, também, o maior efeito detrimental desse patógeno no desenvolvimento das plantas.

Os efeitos do espiroplasma e do fitoplasma na redução da produção de matéria seca, no teor de nutrientes, e na retenção de água, em

diferentes cultivares de milho foram estudados por Oliveira et al. (2005). Os hospedeiros infectados por espiroplasma tiveram reduções na produção de matéria seca mais elevadas do que aqueles infectados por fitoplasma. As plantas infectadas, tanto por espiroplasma quanto por fitoplasma, retiveram em média 15% a 40% a mais de água em relação às plantas não infectadas.

Por outro lado, o isolamento dos agentes causais é impossível em ensaios conduzidos em campo e, por essa razão, a maioria dos estudos sobre o controle genético da resistência do milho aos enfezamentos considera como agente causal o complexo de enfezamento e não os agentes causais de forma separada.

Um estudo pioneiro sobre a resistência do milho aos enfezamentos foi conduzido por Nelson e Scott (1973) com o emprego de um dialelo parcial entre 10 linhagens. As avaliações foram realizadas em região de clima temperado e permitiram a identificação das capacidades geral e específica de combinação com a predominância do efeito aditivo na herança da resistência aos enfezamentos.

Alguns trabalhos já foram conduzidos no Brasil visando estudar o controle genético da resistência aos enfezamentos em milho. Um dialelo completo entre híbridos com diversos graus de resistência/suscetibilidade mostraram a predominância dos efeitos aditivos, a ausência de recíprocos e a alta herdabilidade no controle genético da resistência do milho aos enfezamentos (SILVA et al., 2003). A predominância dos efeitos aditivos e a presença dos efeitos de dominância também estiveram presentes no controle da resistência do milho aos enfezamentos no estudo conduzido por Silveira et al. (2008) que empregou o dialelo parcial entre 12 linhagens. Já Oliveira et al. (2013) utilizaram um isolado do agente

causal, espiroplasma, no estudo do controle genético da resistência. Nesse trabalho, foi utilizado um dialelo completo entre 4 linhagens, que mostrou a predominância de efeitos aditivos, embora tenha sido observado também o efeito significativo de genes não aditivos no controle genético da resistência do milho ao espiroplasma.

Um tópico recorrente na avaliação de resistência de plantas a patógenos é a escolha de caracteres ideais para a mensuração da reação da planta. Esses caracteres terão maior potencial de uso na seleção de plantas resistentes em programas de melhoramento se tiverem alta herdabilidade, e se forem associados aos prejuízos causados pelo patógeno e, ainda, se forem de fácil mensuração. A incidência de plantas com sintomas do enfezamento, medida em termos percentuais, é o caráter que vem sendo empregado na maioria dos estudos sobre o controle genético da resistência. Entretanto, escalas de notas para avaliação da severidade dos sintomas também vem sendo empregadas. Cultivares de milho com diferentes níveis de resistência foram hibridizados por Silva et al. (2002) para a identificação de caracteres mais eficientes para discriminação de níveis de resistência. A incidência de plantas com sintomas foliares dos enfezamentos foi a característica mais eficiente para discriminar os níveis de resistência.

Técnicas moleculares já foram empregadas em estudos com o objetivo de elucidar as alterações bioquímicas no milho causadas pelos enfezamentos ou, ainda, para estabelecer protocolos de identificação e seleção de plantas resistentes. As alterações bioquímicas em plantas de milho infectadas por fitoplasma foram estudadas por Junqueira et al. (2004). As plantas inoculadas mostraram redução no conteúdo proteico, açúcares redutores e compostos fenólicos, assim como redução no conteúdo de clorofila,

mostrando que o fitoplasma interfere na fotossíntese, podendo levar à senescência do tecido foliar. A seleção fenotípica para o percentual de plantas com sintomas do enfezamento foi empregada por Teixeira et al. (2013) para a identificação de marcadores moleculares associados à resistência e passíveis de serem empregados na seleção de plantas resistentes. Para tanto, foram usadas famílias segregantes derivadas do cruzamento entre linhagens-elite e um acesso de banco de germoplasma de milho denominado “composto corn stunt”, obtido por Miranda Filho et al. (2000) por meio da recombinação de genótipos resistentes. Entretanto, não foram identificadas boas correlações entre a seleção fenotípica e os marcadores moleculares avaliados.

De uma maneira geral, a predominância de agentes causais de doenças, e seus patótipos é variável, de local para local, assim como ao longo do tempo, em maior ou menor grau. A variabilidade genética do espiroplasma de 17 isolados originários da Argentina, Brasil, Estados Unidos, Costa Rica, México e Marrocos foi estudada por meio da genotipagem, por Carpane et al. (2013). Entre os 17 isolados, mesmo que originários de diversos países, houve baixo polimorfismo, o que sugere que o genoma do espiroplasma seja altamente conservado, sendo provável que instabilidades da resistência não sejam devidas à geração de novos patógenos e sim a outros componentes do complexo sistema patológico responsável pela quebra da resistência.

Emprego da resistência do milho aos enfezamentos no desenvolvimento de cultivares

O desenvolvimento de cultivares de milho, visando ou não a resistência a estresses, deve considerar a demanda do mercado de sementes para que as novas cultivares tenham bom potencial de uso. O uso de alta tecnologia no cultivo de milho do Brasil é uma tendência crescente. O mercado de sementes e aspectos das cultivares registradas, disponíveis nesse mercado, foram analisados por Cruz et al. (2014). Segundo esses autores, é comum encontrar agricultores brasileiros com média de produtividade de 12 t/ha, chegando a patamares acima de 15 t/ha, em condições irrigadas. Entre os fatores que levam a essa evolução, está o uso de cultivares híbridas com genótipos superiores. Para tanto, a cada ano, são oferecidas novas cultivares, à medida que outras cultivares são retiradas do mercado. Nessa substituição, predomina a chegada de cultivares híbridas, especialmente híbridos-simples, ao mercado; assim como o aumento percentual de cultivares transgênicas e precoces.

O comportamento das cultivares de milho disponíveis no mercado brasileiro na safra 2014/2015, em relação às principais doenças, entre elas, o enfezamento, também são apresentadas por Cruz et al. (2014). Nesse levantamento, as cultivares são classificadas na seguinte gama de reações ao enfezamento: altamente tolerante, tolerante, medianamente tolerante, baixa tolerância, medianamente resistente, resistente, medianamente susceptível, susceptível e ainda, sem informação. Entre as 478 cultivares de milho, disponíveis no mercado para a safra 2014/2015, 35,56% estão sem informação sobre a reação ao enfezamento. Ainda, 40,17% das cultivares são classificadas como: resistente, medianamente resistente, altamente tolerante ou tolerante, ou seja, apresentam algum grau de resistência aos enfezamentos. Um total de 24,27% das cultivares são classificadas como: medianamente tolerantes, medianamente

suscetível, suscetível ou com baixa tolerância, ou seja, podem ser agrupadas pelo baixo nível de resistência.

Tendo em vista a falta de informação sobre o desempenho das cultivares disponíveis no mercado, em relação à reação aos enfezamentos, fica notório que a avaliação de resistência aos enfezamentos não tem sido uma das prioridades no melhoramento. Por outro lado, o avanço nos danos leva à necessidade de maiores esforços, não apenas na avaliação das cultivares em fase de pós-melhoramento, mas também no desenvolvimento de genótipos de alto valor de mercado com bons níveis de resistência aos enfezamentos.

Diante desse cenário, é importante que, no planejamento das atividades de um programa de melhoramento de milho sejam consideradas, a demanda de mercados por híbridos e a predominância dos efeitos aditivos, no controle da resistência do milho aos enfezamentos. Dessa forma, a incorporação de alelos que conferem a resistência aos enfezamentos em linhagens-elite de alto desempenho, por meio do método do retrocruzamento, poderá levar à rápida obtenção de linhagens que associem resistência à alta performance.

A predominância dos efeitos aditivos no controle da resistência tem implicações práticas no programa de melhoramento. A primeira delas é que o desempenho dos híbridos é altamente correlacionado com o fenótipo de suas linhagens genitoras. Então, a simples avaliação de linhagens é de grande aplicabilidade. Em um programa de melhoramento de milho o número de linhagens é muito menor do que o número de combinações híbridas entre elas, por exemplo, 10 linhagens, podem ser combinadas formando 45 híbridos simples. Assim, a avaliação da resistência de linhagens de milho aos

enfesamentos pode ser conduzida em casa de vegetação, onde a utilização de cigarrinhas sabidamente infectantes com espiroplasma ou fitoplasma permite a adequada identificação do agente causal, o que é fundamental para a boa qualidade no desenvolvimento de genótipos resistentes.

Outra implicação prática da predominância dos efeitos aditivos no controle da resistência é a necessidade da introgressão dos alelos que conferem a resistência em ambos os genitores de um híbrido. No caso do milho, é importante considerar que os programas de melhoramento são estruturados para desenvolver genótipos que maximizem o efeito da heterose e, para tanto, seus genótipos-elite são frequentemente classificados em grupos heteróticos, e os híbridos mais promissores são obtidos pelo cruzamento de linhagens integrantes de diferentes grupos heteróticos. Então, é importante que os alelos que conferem a resistência sejam introgridos em linhagens representantes de ambos os grupos heteróticos para que elas possam estar presentes nos dois genitores de um híbrido de alta performance.

A avaliação de linhagens, embora seja fundamental e eficiente, no caso de resistência aos enfesamentos, não dispensa a avaliação de híbridos por diversas razões. A primeira delas é devida ao efeito não aditivo, observado em alguns estudos, do controle genético da resistência, e a segunda razão, deve-se ao fato desses estudos não serem conclusivos. Além disso, a avaliação de híbridos se faz necessária por esse ser esse o produto final do melhoramento, que deve ser avaliado em campo, quanto a sua estabilidade em diversas condições ambientais.

O programa de melhoramento de milho envolve diversas etapas e, possivelmente, a etapa de avaliação de genótipos superiores, em

redes de ensaios, seja a ocasião em que é considerada o maior número de condições ambientais. A avaliação da resistência aos enfezamentos nessa etapa é fundamental para avaliar a estabilidade da fonte de resistência.

A etapa final de um programa de melhoramento, também denominada pós-melhoramento, abrange a classificação de cultivares já prontas para serem lançadas no mercado, quanto a sua reação aos patógenos. Entretanto, tendo em vista a inexistência de informações sobre a reação aos enfezamentos para 35,56% das cultivares disponibilizadas na safra 2014/2015, nota-se que, boa parte das cultivares chegam ao mercado sem essa informação.

Assim, é possível supor que, em diversas fases de um programa de melhoramento de milho, desde a fase da escolha de genitores, passando pela fase de avaliação em ensaios conduzidos em rede, até a fase de pós-melhoramento é possível inserir atividades que considerem a resistência aos enfezamentos.

Considerações finais

O conhecimento do controle genético da resistência do milho aos enfezamentos causados por mollicutes tem como objetivo principal a sua aplicação no melhoramento para o desenvolvimento de cultivares resistentes. O potencial de crescimento dos prejuízos causados por essas doenças, especialmente com o aumento da safrinha, leva à necessidade de mais estudos sobre esse controle genético, com identificação do agente causal, especialmente do espiroplasma, uma vez que está associado aos maiores prejuízos. A

avaliação de genótipos de milho quanto à resistência aos enfezamentos, em diversas fases do programa de melhoramento é fundamental para a obtenção e para uso de cultivares resistentes no controle de danos causados por essas doenças.

Referências

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 1997. 547 p.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas**: princípios e procedimentos. Lavras: UFLA, 2001. 282 p.

CARPANE, P.; ULRICH, M.; WAYADANDE, A.; PECCI, M. P. G.; LAGUNA, G.; POLEZAL, W.; FLETCHER, J. An analysis of the genomic variability of phytopathogenic mollicute *Spiroplasma kunkelli*. **Phytopathology**, v. 103, p. 129-134, 2013.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; SIMÃO, E. P. **478 cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes no Brasil para a safra 2014/2015**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 35 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/116100/1/doc167.pdf>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

FEHR, W. R. **Principals of cultivar development**: theory and technique. New York: Macmillan Publishing Company, 1987. v. 1, 536 p.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**: tabela 839 - área plantada, área colhida, quantidade produzida e rendimento médio de milho, primeira e segunda safras. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=839&z=t&o=11>>. Acesso em: 13 out. 2015.

JUNQUEIRA, A.; BEDENDO, F.; PASCHOLATI, S. Biochemical changes in corn stunt plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, p. 181-185, 2004.

MIRANDA FILHO, J. B. de; NASS, L. L.; SANTOS, M. X. dos; REGITANO NETO, A. **Avaliação dos acessos de milho para resistência a doenças foliares**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 147 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 3).

NELSON, L. R.; SCOTT, G. Diallel analysis of resistance of corn (*Zea mays* L.) to corn stunt. **Crop Science**, v. 13, p. 162-164, 1973.

OLIVEIRA, E. de; CARVALHO, R. V. de; DUARTE, A. P.; ANDRADE, R. A. de; RESENDE, R. de O.; OLIVEIRA, C. M. de; RECCO, P. C. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 2, p. 38-46, 2002a.

OLIVEIRA, E. de; GAMA, E. E. G. e; TEIXEIRA, F. F.; OLIVEIRA, A. C. de; SILVA, A. R. da. Genetic control of maize resistance to corn stunt spiroplasma. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 3, n. 2, p. 67-71, 2013.

OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, C. M. de; MAGALHÃES, P. C.; ANDRADE, C. de L. T.; HOGENHOUT, S. A. Spiroplasma and phytoplasma infection reduce kernel production, and nutrient and water contents of several but not all maize cultivars. **Maydica**, v. 50, p. 171-178, 2005.

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

OLIVEIRA, E. de; RESENDE, R. de O.; GIMÉNEZ PECCI, M. de la P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Ocorrência e perdas causadas por mollicutes e vírus na cultura do milho safrinha no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 19-25, jan. 2003.

OLIVEIRA, E. de; SANTOS, J. C.; MAGALHAES, P. C.; CRUZ, I. **Mudanças climáticas poderão favorecer doença causada por fitoplasma na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 4 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 126).

SILVA, R. G.; GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; OLIVEIRA, E. Controle genético da resistência ao enfezamento em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 921-928, 2003.

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

SILVEIRA, F. T.; MARRO, J. R.; SILVA, H. B.; OLIVEIRA, J. A.; PERECIN, D. Herança da resistência ao enfezamento em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1717-1722, 2008.

TEIXEIRA, F. F.; COSTA, F. M.; SABATO, E. O.; LEITE, C. E. P.; MEIRELLES, W. F.; GUIMARÃES, C. T.; BELICUAS, S. N. J. Pré-melhoramento de milho quanto à resistência a enfezamentos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 51-58, 2013.

Capítulo 12

Avaliação da resistência genética do milho aos enfezamentos causados por mollicutes

Elizabeth de Oliveira Sabato | Flavia França Teixeira | Elcio de Oliveira Alves



Resistência genética e controle de doenças de plantas

A utilização de cultivares de plantas com resistência genética para controlar doenças, além de ser, em geral, o método mais eficiente, contribui para evitar ou reduzir a utilização de produtos

fitossanitários, que oneram custos de produção e, em alguns casos, podem ser contaminantes para o ambiente.

Naturalmente, as espécies vegetais apresentam variação quanto à resistência às doenças, e os patógenos apresentam variação quanto à patogenicidade ao hospedeiro. Considerando diferenças que ocorrem nas interações patógeno-hospedeiro, a resistência das plantas a doenças é classificada essencialmente em dois tipos distintos: resistência vertical e resistência horizontal. A resistência do tipo vertical é um sistema em que a variação do patógeno está qualitativamente associada com a variação do hospedeiro, sendo que raças do patógeno causam doença apenas em determinadas “variedades” desse hospedeiro. Nesse sistema da resistência vertical do hospedeiro, a variação do patógeno é denominada virulência. No sistema da resistência horizontal, o patógeno varia independentemente de diferenças nas “variedades” do hospedeiro. Nesse caso, a variação do patógeno é denominada agressividade. Contudo, nas interações patógeno-hospedeiro, a resistência horizontal está provavelmente sempre presente, sendo possível ocorrer simultaneamente as duas formas (VANDERPLANK, 1978).

Para obter-se um híbrido de milho com resistência genética a uma doença, é importante conhecer aspectos do controle genético do tipo de resistência predominante para essa doença, para escolher o método de seleção mais adequado e obter maior eficiência no processo de seleção.

O controle genético da resistência vertical, que é específica para uma ou algumas raças do patógeno é, caracteristicamente, do tipo dominante-recessivo, e envolve um ou poucos genes. A resistência horizontal, inespecífica contra todas as raças do patógeno, é controlada por muitos genes. No melhoramento genético do milho, o

retrocruzamento é o método indicado para a transferência de poucos alelos de uma linhagem para outra a ser usada na produção do híbrido resistente, sendo o método da seleção recorrente indicado para proporcionar a recombinação de alelos que conferem resistência, quando a resistência é do tipo horizontal (CAMARGO, 1995).

Por outro lado, o conhecimento sobre a variabilidade do patógeno em questão permite estabelecer estratégias para o uso de cultivares com resistência genética, de forma a evitar a possível “quebra” dessa resistência, resultante da seleção de variante genética do patógeno capaz de vencer a resistência da planta.

Enfezamentos do milho

Os enfezamentos do milho são doenças sistêmicas, causadas por mollicutes (classe Mollicutes) e diferenciam-se em duas, por serem distintos os seus agentes causais. O enfezamento-pálido é causado por espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*) e o enfezamento-vermelho é causado por fitoplasma (*Maize bushy stunt phytoplasma*). Esses mollicutes são transmitidos de forma persistente-propagativa pela cigarrinha *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). O sintoma diagnóstico do enfezamento-pálido é a presença de estrias cloróticas, esbranquiçadas, irregulares, que se estendem da base para o ápice nas folhas. Porém, plantas infectadas por espiroplasma podem apresentar apenas clorose, e avermelhamento nas margens e ápice das folhas. O enfezamento-vermelho se caracteriza por intenso avermelhamento da planta, seguido por seca. As espigas produzidas por plantas com qualquer uma dessas duas doenças

têm tamanho reduzido e podem apresentar grãos chochos, ou poucos grãos. Em algumas cultivares de milho, ocorre proliferação de espigas e perfilhamento na base da planta. (BASCOPE, 1977; NAULT, 1980; WHITCOMB et al., 1986; BEDENDO et al., 1997). A cigarrinha *D. maidis* pode transmitir apenas um desses patógenos, ou ambos, simultaneamente, assim como a planta de milho pode ser infectada por apenas um, ou por ambos (OLIVEIRA et al., 2007, 2015a). A cigarrinha *D. maidis*, que se alimenta e se reproduz apenas no milho, migra de plantas adultas para plântulas de milho, disseminando os mollicutes (OLIVEIRA et al., 2002a, 2013a, 2015b). As plântulas de milho infectadas nos estádios iniciais de desenvolvimento têm a fisiologia e a nutrição afetadas pela doença, e expressam sintomas na fase de produção (OLIVEIRA et al., 1998, 2002c, 2005; MASSOLA JÚNIOR et al., 1999). No campo, não é possível distinguir com segurança entre os dois tipos de enfezamentos, exceto quando presente na planta apenas as estrias cloróticas, esbranquiçadas, indicativas de infecção com espiroplasma.

Resistência genética do milho aos enfezamentos

Há carência de informações sobre o controle genético da resistência do milho ao enfezamento-pálido e ao enfezamento-vermelho. Contudo, estudos conduzidos em campo e, ao menos um, em condições controladas de inoculação, em viveiro telado protegido contra insetos, indicam a presença de efeitos aditivos e de efeitos não aditivos na herança genética da resistência do milho a essas

doenças (SILVA et al., 2003; SILVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013b).

O controle genético da resistência do milho ao espiroplasma, incluindo genes com efeitos aditivos e genes com efeitos de dominância ou de epistasia, além de possível efeito associado ao lado materno na herança da resistência, evidencia tratar-se de uma herança complexa (OLIVEIRA et al., 2013b).

Resultados diferentes obtidos nesses estudos, com relação à predominância de efeitos aditivos ou de efeitos não aditivos (MENDONZA-ELOS et al., 2002; SILVEIRA et al., 2008), podem ser possivelmente atribuídos ao comportamento diferente dos vários genótipos de milho utilizados, ou pela ocorrência de infecção simultânea das plantas com espiroplasma e fitoplasma.

A seleção de genótipos de milho resistentes aos enfezamentos causados por molicutes tem sido feita, essencialmente, em campo, em condições de infecção natural das plantas com esses patógenos (TEIXEIRA et al., 2013).

Avaliação da resistência do milho aos enfezamentos

Exposição de genótipos de milho ao inóculo natural dos molicutes

Em campo, a infecção das plantas de milho com molicutes é dependente do inóculo natural, proporcionado por cigarrinhas

infectantes que migram de lavouras de milho, com plantas adultas doentes, para as plântulas sadias recém-emergidas em novas lavouras de milho (OLIVEIRA et al., 2013a). A densidade populacional dessas cigarrinhas infectantes pode variar em função da quantidade de lavouras adultas presentes nas imediações da área em que se pretende avaliar genótipos de milho para a resistência aos enfezamentos, e também, das condições climáticas, que podem ser boas ou não para a transmissão desses patógenos e o desenvolvimento da doença (OLIVEIRA et al., 2007).

Tem sido demonstrado que, em geral, no milho semeado tardiamente, na safra de verão, e no milho safrinha (segunda safra) que também é milho de semeadura tardia, ocorre maior incidência dos enfezamentos (OLIVEIRA et al., 1998, 2002b, 2002c, 2015b). Essa maior incidência pode ser atribuída à maior concentração do inóculo desses patógenos, proporcionado por vários ciclos da cigarrinha, e disseminação dos mollicutes de uma lavoura para outra, causada pelas sobreposições do ciclo do milho, devido às variações nas datas de semeadura (OLIVEIRA et al., 2013a).

Considerando-se esses aspectos, a semeadura de genótipos de milho para avaliação da resistência aos enfezamentos deve ser feita preferencialmente na época da segunda safra, ou durante a fase de produção da safra anterior.

Por ser incerta e variável a incidência dessas doenças, em decorrência da dependência do inóculo natural, cujo nível de concentração depende de diversos fatores ambientais, é importante incluir sempre, entre os genótipos que serão avaliados, um milho altamente suscetível aos enfezamentos, para servir como indicador da incidência dessas doenças, e de referencial para comparações dos níveis de suscetibilidade ou de resistência dos materiais em

avaliação. O milho-pipoca é, em geral, suscetível, e pode ser usado para isso.

Parcelas do milho-indicador dos enfezamentos devem ser intercaladas entre as parcelas dos genótipos a serem avaliados. É importante ressaltar que, o milho-pipoca tem ciclo mais curto que outros genótipos de milho e, em geral, mostra sintomas dos enfezamentos em menor período de tempo que outros, sendo necessário inspecionar a área para decidir o melhor momento para a avaliação. Uma vez que lavouras comerciais de cultivares de milho suscetível podem ter todas as plantas afetadas pelos enfezamentos e perda total da produção (OLIVEIRA et al., 1998), quando o nível de incidência dessas doenças no milho-indicador é superior a 50% das plantas com sintomas, supõe-se que seja adequada essa pressão de doenças para comparação dos outros genótipos.

Esse milho suscetível, utilizado como indicador para as avaliações da incidência de enfezamentos, pode ser usado também para coleta de amostras de folhas para, em laboratório, serem submetidas ao teste de PCR para detecção de espiroplasma e de fitoplasma (LEE et al., 1993; BARROS et al., 2001). Isto é importante para conhecer a predominância de cada um desses mollicutes na área (em 10 amostras analisadas).

Entretanto, é possível usar uma prática para aumentar a incidência natural dos enfezamentos causados por mollicutes, descrita no tópico seguinte.

Alternativa para aumentar o inóculo natural dos mollicutes no campo

Escolher localidade de clima quente, em que se cultiva o milho safrinha, para a semeadura de genótipos de milho a serem avaliados quanto à resistência aos enfezamentos, e semear esses materiais na época de semeadura do milho safrinha é prática que visa expor os genótipos a concentrações mais elevadas de inóculo dos agentes causais dessas doenças. Porém, essa exposição pode ser maior quando esses genótipos são semeados em proximidade a lavouras de milho com plantas adultas, se possível, em estações experimentais de pesquisa com milho, onde geralmente há grande diversidade de genótipos suscetíveis a essas doenças, uma vez que as cigarrinhas emigram das plantas de milho adultas (OLIVEIRA et al., 2015b) em busca de novas plântulas (OLIVEIRA et al., 2002a, 2013a). Considerando que o milho-pipoca é altamente suscetível aos enfezamentos, semear esse tipo de milho ao lado da área escolhida, cerca de 50 dias antes da data de semeadura dos genótipos a serem avaliados, permite concentrar cigarrinhas e molicutes. Esse milho-pipoca semeado com antecedência será fonte de inóculo dos molicutes para a infecção dos genótipos de milho a serem avaliados.

Inoculação dos molicutes em genótipos de milho

Plântulas de milho submetidas à inoculação com molicutes podem ser cultivadas em vasos em viveiro telado protegido contra insetos (NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 2010) ou em campo, e esse procedimento pode ser utilizado para avaliar a resistência de genótipos aos enfezamentos.

Quando as plântulas de milho são submetidas à inoculação com molicutes e cultivadas em vasos, os sintomas foliares característicos

dos enfezamentos se manifestam entre 50 e 60 dias após a semeadura, enquanto no campo, em geral, esses sintomas se manifestam na fase de enchimento de grãos (90 a 100 dias após a semeadura). Observa-se que, em campo, as plântulas infectadas por apenas um dos mollicutes podem ser novamente infectadas por fitoplasma e/ou por espiroplasma, limitando a avaliação de efeitos isolados desses agentes. Essas plantas podem ser também infectadas por vírus, o que dificulta a discriminação precisa dos sintomas de cada doença.

As plântulas de milho podem ser submetidas à inoculação após a germinação no vaso, ou no campo. Alternativamente, podem ser germinadas em recipientes pequenos, e transplantadas para o local de cultivo, após a inoculação dos mollicutes.

O Capítulo 10, deste livro, apresenta de forma detalhada, metodologia e procedimentos para a criação da cigarrinha *D. maidis*, preservação de plantas-fonte de mollicutes, aquisição e inoculação desses patógenos. De forma sumarizada, sequencialmente, esse processo consiste em: a) obtenção de colônias de cigarrinhas *D. maidis* sadias, a partir da eclosão de ovos incubados em placa de Petri com papel de filtro úmido e alimentação das ninfas com plântulas de milho sadias em gaiolas de tela, até a obtenção de jovens adultos (tempo do procedimento: 20 a 30 dias); b) aquisição de espiroplasma ou de fitoplasma por meio do confinamento de cigarrinhas jovens, ou de ninfas em último estágio de desenvolvimento, em planta-fonte infectada, durante cinco a sete dias, utilizando-se saco de tecido “voil”; c) obtenção de cigarrinhas infectantes após período latente necessário para multiplicação dos mollicutes (quatro semanas, incluindo o período de aquisição) e alimentação com plântulas de milho sadias; d) inoculação em

plântulas de milho, preferencialmente, aos 8 dias após a semeadura, confinando-se, em cada plântula, pelo menos duas cigarrinhas infectantes com espiroplasma ou três cigarrinhas infectantes com fitoplasma, durante 5 dias, sendo essas cigarrinhas provenientes de populações previamente submetidas à aquisição desses mollicutes e ao período latente necessário para sua multiplicação nos insetos.

É importante observar que nas populações de cigarrinhas usadas para aquisição do espiroplasma, a eficiência de transmissão desse patógeno é alta, sendo cada inseto capaz de transmiti-lo após período latente de cerca de três a quatro semanas, o que não acontece no caso do fitoplasma, uma vez que, muitos insetos não se tornam infectantes com esse patógeno (BASCOPE, 1977; NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 2007).

A inoculação dos mollicutes não deve ser feita em épocas do ano em que predominam temperaturas amenas (temperatura média em torno de 20 °C), que ocorrem nos meses de maio, junho, julho, agosto, na região Sudeste, pois não são adequadas para a multiplicação desses patógenos, nas cigarrinhas e nas plantas. Observa-se que a multiplicação do espiroplasma em cultivo in vitro ocorre em temperaturas em torno de 30 °C (LEE; DAVIS, 1984; WHITCOMB et al., 1986).

As gaiolas para confinamento das cigarrinhas devem sempre ter aeração, e podem ser de tamanho adequado para confinar a plântula de milho, ou pequenas, para confinar as cigarrinhas em apenas uma parte de uma folha.

Em viveiro telado, cada genótipo de milho deve ser avaliado em pelo menos cinco repetições de parcelas de uma planta por vaso,

utilizando-se, como controle da eficiência da inoculação, cinco parcelas de milho-pipoca, suscetível aos enfezamentos.

Ressalta-se que as sementes dos genótipos de milho a serem submetidos à inoculação com os molicutes, não devem ser tratadas com inseticidas, para evitar que esse inseto-vetor possa morrer antes de transmitir os patógenos para as plântulas de milho.

Avaliações e comparações

Como os sintomas dos enfezamentos aparecem nas plantas caracteristicamente na fase de produção (OLIVEIRA et al., 1998), a avaliação da incidência dessas doenças deve ser feita nessa fase. Os níveis de incidência de enfezamentos obtidos para diferentes genótipos de milho, semeados em mesma data e local, podem ser diretamente comparados, sendo tanto mais resistente o genótipo quanto menor for esse nível. Observa-se que os resultados obtidos para os níveis de incidência serão tanto mais confiáveis quanto maior for o nível médio de incidência dessas doenças obtido para as parcelas do milho-indicador (milho-pipoca suscetível).

Contudo, é possível também avaliar o nível de severidade dos enfezamentos, que pode variar tanto em função do estágio de desenvolvimento em que a plântula de milho foi infectada com molicute quanto devido ao nível de resistência genética do genótipo.

Para se determinar a incidência de enfezamentos em cada parcela experimental, conta-se o número total de plantas na(s) fileira(s) a ser(em) avaliada(s) e o número de plantas com sintomas de enfezamento. Calcula-se o percentual de incidência de enfezamento, para cada parcela, pela fórmula: Incidência (%) = n°

de plantas com sintomas x 100/ nº total de plantas. Calcula-se o nível médio de incidência através da média aritmética dos níveis de incidência obtidos para as parcelas repetidas de cada genótipo.

A severidade dos enfezamentos pode ser avaliada usando escala de notas aritméticas, como sugerido a seguir: (-) ausência de sintomas; (+) sintomas em uma folha; (++) sintomas em 25% das folhas; (+++) sintomas em até 50% das folhas; (++++) sintomas em mais de 50% das folhas; (+++++) sintomas em várias folhas, redução no tamanho de internódios e altura, espigas pequenas.

Essa severidade pode ser determinada individualmente, para cada planta a ser avaliada, ou estimada para toda a parcela a ser avaliada.

Contudo, como os enfezamentos são doenças sistêmicas, recomenda-se como mais adequada a avaliação da incidência (percentual de plantas com sintomas) para a seleção de genótipos com resistência genética.

Variabilidade genética dos mollicutes

Estudos sobre a variabilidade molecular do *Spiroplasma kunkelii* e do MBS-fitoplasma não têm evidenciado diferenças marcantes entre isolados geográficos (GOMES et al., 2004; CARPANE, 2007).

Entretanto, estudos sobre a transmissão desses patógenos por *D. maidis* em milho indicam diferenças entre isolados, e possível adaptação fisiológica para isolado cultivado sucessivamente, por

vários anos, em um mesmo genótipo de milho (OLIVEIRA et al., 2015a).

Fatores que afetam os enfezamentos e a seleção de genótipos de milho resistentes

Sendo a cigarrinha *D. maidis* o inseto-vetor do espiroplasma e do fitoplasma, obviamente, sua presença na lavoura de milho é fator essencial para a transmissão desses patógenos para as plântulas, e consequente incidência dos enfezamentos. Espera-se assim que quanto maior for o nível de incidência de cigarrinhas em uma lavoura de milho maior será o nível de incidência dos enfezamentos. Entretanto, é importante lembrar que nem todas as cigarrinhas presentes em uma lavoura de milho são infectantes com espiroplasma e/ou com fitoplasma (OLIVEIRA et al., 2015a). Além disso, as condições climáticas podem influenciar a expressão dos sintomas dessas doenças, que são favorecidas por temperaturas médias diurnas em torno de 27 °C a 30 °C e, simultaneamente, temperaturas médias noturnas acima de 17 °C (OLIVEIRA et al., 2007, 2010).

Assim, o nível de incidência dos enfezamentos em uma lavoura dependerá, essencialmente, da incidência de cigarrinhas infectantes com espiroplasma, e/ou fitoplasma, das condições climáticas predominantes, e do nível de suscetibilidade da cultivar de milho a esses patógenos.

A avaliação da abundância da cigarrinha *D. maidis* em função do ciclo do milho mostrou aumento na quantidade desse inseto-vetor

desde os estádios iniciais de desenvolvimento das plântulas até a fase de florescimento, e decréscimo posterior. Esse aumento na quantidade de cigarrinhas pode ser atribuído aos insetos imigrantes e aos insetos que nascem a partir destes, na lavoura de milho. O decréscimo de cigarrinhas a partir do florescimento do milho pode ser atribuído à emigração dos insetos para lavouras mais jovens (OLIVEIRA et al., 2015b). Esse movimento migratório da cigarrinha pode resultar na concentração desses insetos em áreas de milho de semeadura tardia, principalmente em lavouras jovens nas proximidades de lavouras com plantas adultas. Pode também permitir a dispersão e, com isso, redução da densidade populacional desse inseto nas plântulas de muitas lavouras jovens, quando há sincronização na semeadura do milho em um período curto (cerca de 20 dias, considerando que o ciclo da cigarrinha é de cerca de 20 a 25 dias), em uma região.

O conhecimento dos fatores que favorecem a incidência dos enfezamentos em lavouras de milho permite compreender porque essas doenças têm sido detectadas em maiores níveis de incidência em lavouras de semeadura tardia, e no milho safrinha. O milho da safra de verão é semeado com grande variação em datas de semeadura e, por essa razão, permite o aumento sucessivo de cigarrinhas e de mollicutes que, em função da atividade migratória desse inseto-vetor, concentram-se nas lavouras semeadas tardiamente, e no milho safrinha. É importante lembrar que, o milho safrinha, também denominado de “segunda safra”, em relação ao milho da safra de verão, pode ser considerado de semeadura tardia, portanto sujeito à alta população de cigarrinhas migrantes de lavouras adultas, em fase de produção, da safra anterior. Nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, os enfezamentos têm sido

detectados em altos níveis de incidência, no milho safrinha (OLIVEIRA et al., 2002b).

Recentemente, foram confirmados maiores níveis de incidência de cigarrinhas *D. maidis* (OLIVEIRA et al., 2015b) e de enfezamentos (ver [Capítulo 13](#)) em períodos de safrinha, em milho semeado experimentalmente, em várias datas, para comparação.

A infecção simultânea das plântulas de milho com ambos os mollicutes e com o *Maize rayado fino virus*, que também é transmitido pela cigarrinha *D. maidis* e/ou com potyvirus transmitidos por pulgões (COSTA et al., 1971), afeta os sintomas na planta e torna difícil avaliações e seleção para a resistência aos enfezamentos.

Seleção da resistência a campo versus seleção da resistência com inoculação: vantagens e limitações

A seleção da resistência genética de genótipos de milho aos enfezamentos, por meio de exposição ao inóculo natural em campo, pode ser vantajosa, menos trabalhosa, e de menor custo, para a avaliação de grande número de materiais, que a seleção usando inoculação desses patógenos em condições controladas. Além disso, em geral, no campo, as plantas de milho são expostas a níveis de pressão do inóculo dos patógenos, possivelmente menores que os níveis de pressão do inóculo usado na inoculação.

Por outro lado, em campo, não é possível diferenciar entre os dois tipos de enfezamentos com base apenas nos sintomas e a detecção

de fitoplasma e/ou espiroplasma em grande número de amostras é limitada, seja por técnicas moleculares ou por microscopia eletrônica, por causa da distribuição desuniforme dos patógenos nos tecidos da planta, e das limitações próprias dessas técnicas para análises de muitas amostras (OLIVEIRA et al., 1998, 2002c). Outro fator limitante é a possível infecção simultânea das plantas por mollicutes e por vírus, que pode dificultar as avaliações.

O procedimento para inoculação de mollicute em plântulas de milho em viveiro telado permite identificar o patógeno a ser inoculado, e identificar mais rapidamente genótipos de milho com resistência genética, uma vez que os sintomas da doença aparecem mais cedo nas plantas cultivadas em vasos, que em campo (OLIVEIRA et al., 2007, 2015a). Por outro lado, esse procedimento é mais trabalhoso, pode significar maior custo, e limitar o número de genótipos que podem ser avaliados em um período de tempo. Além disso, a pressão de inóculo proporcionada pelo confinamento de cigarrinhas infectantes nas plântulas de milho pode ser alta, em relação às condições de campo, restringindo a seleção de materiais que possam apresentar comportamento de resistência de campo, proporcionada por diferentes mecanismos.

Alternativas para avaliações

Assim, pode ser conveniente usar ambas as formas para identificar genótipos de milho com resistência genética aos mollicutes em programa de melhoramento do milho para resistência aos enfezamentos. A inoculação em viveiro telado pode ser usada para identificar fontes de resistência a serem usadas em campo. Também

pode ser usada para confirmar a resistência dos genótipos de milho selecionados em campo, e para avaliar a reação desses genótipos a cada um dos mollicutes, separadamente.

É possível inocular os mollicutes diretamente em plântulas de milho no campo, ou transplantar plântulas previamente submetidas à inoculação com esses patógenos. Contudo, esta última metodologia não é conveniente, uma vez que, as plântulas infectadas serão expostas ao inóculo natural dos mollicutes, e podem ser infectadas novamente. Além disso, vírus podem infectar essas plantas e dificultar a identificação dos sintomas e danos causados apenas pelos enfezamentos. Uma alternativa para essa situação é usar intensiva pulverização com inseticidas para evitar insetos-vetores de mollicutes e vírus, ao menos nos estádios iniciais de desenvolvimento das plântulas.

Para o melhoramento do milho para resistência aos enfezamentos, Mendonza-Elos et al. (2002) sugerem usar a seleção recorrente para populações com algum nível de resistência, ou retrocruzamento para incorporar esta resistência em linhagens suscetíveis. Scott e Rosenkranz (1974) também consideram a seleção recorrente um método eficiente para esse fim.

Como há efeito de dominância no controle genético da resistência ao enfezamento causado por espiroplasma, é importante não apenas avaliar linhagens per se em viveiro telado, mas também avaliar essas linhagens em cruzamentos em campo (OLIVEIRA et al., 2013b).

Entretanto, é importante ressaltar que há carência de informações, principalmente sobre o controle genético da resistência ao

enfezamento-vermelho causado pelo MBS-fitoplasma, e sobre a variabilidade de ambos os mollicutes.

Considerações finais

Considerando que os estudos sobre a variabilidade molecular e fisiológica dos mollicutes agentes causais dos enfezamentos do milho não têm indicado a existência de raças, é possível esperar comportamento de estabilidade da resistência de cultivares de milho em diferentes ambientes. Essa estabilidade da resistência aos enfezamentos tem sido empiricamente confirmada por técnicos que atuam nessa cultura.

Por outro lado, indicativos de adaptação fisiológica de isolado sucessivamente cultivado no mesmo genótipo de milho, em viveiro telado (OLIVEIRA et al., 2015a), sugerem que mecanismos semelhantes podem ocorrer no campo, sendo possível esperar a perda da resistência de uma cultivar de milho quando seguidamente cultivada, por muitos anos, em mesma região. Isso pode permitir a seleção, a adaptação e a proliferação de uma variante genética do patógeno capaz de vencer a resistência da cultivar de milho. Esse efeito pode acontecer, principalmente, se essa cultivar predominar sempre naquela região, exercendo pressão de seleção sobre a população desses patógenos.

É importante considerar também que há evidências de influência da temperatura no comportamento de genótipos de milho com relação à transmissão dos mollicutes e à manifestação de sintomas de enfezamentos. Em condições de temperaturas noturnas mais

elevadas, a incidência de plantas com sintomas do enfezamento-pálido foi maior e, em geral, maior a severidade desses sintomas (OLIVEIRA et al., 2010).

A associação desses fatores pode contribuir para a perda da resistência da cultivar de milho. A prática de diversificação e de rotação de cultivares de milho pode contribuir para preservar a resistência e para minimizar possíveis perdas por essas doenças.

Referências

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

BASCOPE, J. B. O. **Agente causal de la llamada “raza mesa central” del achaparramiento del maiz**. 1977. 55 f. Dissertação (Mestrado) – Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo.

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

CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 470-492.

CARPANE, P. D. **Host resistance and diversity of Spiroplasma kunkelii as component of corn stunt disease**. 2007. 110 f. Tese (Doutorado) – Oklahoma State University, Oklahoma.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma no milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, n. 4, p. 39-41, 1971.

GOMES, E. A.; JARDIM, S. N.; GUIMARÃES, C. T.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, E. Genetic variability of Brazilian phytoplasma and spiroplasma isolated from maize plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 61-65, 2004.

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

LEE, J. M.; DAVIS, R. E. New media for rapid growth of *Spiroplasma citri* and corn stunt spiroplasma. **Phytopathology**, v. 74, n. 1, p. 84-89, 1984.

MASSOLA JÚNIOR, N.; BEDENDO, I. P.; AMORIN, L.; LOPES, J. R. S. Quantificação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 136-142, 1999.

MENDONZA-ELOS, M.; LOPEZ-BANITÉZ, A.; RODRIGUEZ-HERRERA, A. S.; OYERVIDES-GARCIA, A.; DELEON, C.; JEFFERS, P. Accion génica de la resistência al achaparramiento del maiz causado por espiroplasma, fitoplasmas y vírus. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v. 20, p. 13-17, 2002.

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

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R.; NAULT, L. R. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off season in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 147, n. 2, p. 141-153, 2013a.

OLIVEIRA, C. M.; MOLINA, R. M. S.; ALBRES, R. S.; LOPES, J. R. Disseminação de mollicutes a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 91-95, 2002a.

OLIVEIRA, E. de; LANDAU, E. C.; GUIMARAES, P. E. de O.; GUIMARAES, L. J. M. Resistência do milho ao enfezamento causado por espiroplasma e ao enfezamento causado por fitoplasma. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 4., 2010, Goiânia. **Potencialidades, desafios e sustentabilidade**: resumos expandidos... Goiânia: ABMS, 2010. 1 CD-ROM.

OLIVEIRA, E.; CARVALHO, R. V.; DUARTE, A. P.; ANDRADE, R. A.; RESENDE, R. O.; OLIVEIRA, C. M.; RECCO, P. C. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 2, p. 38-46, 2002b.

OLIVEIRA, E.; GAMA, E. E. G.; TEIXEIRA, F. F.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, A. R. Genetic control of maize resistance to corn stunt spiroplasma. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 3, n. 2, p. 68-71, 2013b.

OLIVEIRA, E.; LANDAU, E. C.; SOUSA, S. M. Simultaneous transmission of phytoplasma and spiroplasma by *Dalbulus maidis* leafhopper and symptoms of infected maize. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, p. 99-100, 2015a.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M.; MAGALHÃES, P. C.; ANDRADE, C. T. L.; HOGENHOUT, S. A. Spiroplasma and phytoplasma infection reduce kernel production, and nutrient and water contents of several but not all maize cultivars. **Maydica**, v. 50, p. 171-178, 2005.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M.; SOUZA, I. R. P.; MAGALHÃES, P. C.; CRUZ, I. Enfezamentos em milho: expressão de sintomas foliares, detecção dos mollicutes e

interações com genótipos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 1, p. 53-62, 2002c.

OLIVEIRA, E.; SANTOS, J. C.; MAGALHÃES, P. C.; CRUZ, I. Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affected by Spiroplasma acquisition and environmental conditions. **Bulletin of Insectology**, v. 60, n. 2, p. 229-230, 2007.

OLIVEIRA, E.; TERNES, S.; VILAMIU, R.; LANDAU, E. C.; OLIVEIRA, C. M. Abundance of the insect vector of Mollicutes in the vegetative maize cycle. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, p. 117-118, 2015b.

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

SCOTT, G. E.; ROSENKRANZ, E. E. Effectiveness of recurrent selection for corn stunt resistance in a maize variety. **Crop Science**, v. 14, p. 758-760, 1974.

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

SILVEIRA, F. T.; MORO, J. R.; SILVA, H. P.; OLIVEIRA, J. A.; PERECIN, D. Herança da resistência ao enfezamento em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1717-1723, 2008.

TEIXEIRA, F. F.; COSTA, F. M.; SABATO, E. O.; LEITE, C. E. P.; MEIRELLES, W. F.; GUIMARÃES, C. T.; BELICUAS, S. N. J. Pré-melhoramento de milho quanto à resistência a enfezamentos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 51-58, 2013.

VANDERPLANK, J. E. **Genetic and molecular basis of plant pathogenesis**. Berlin: Springer-Verlag, 1978. 167 p.

WHITCOMB, R. F.; CHEN, T. A.; WILLIAMSON, D. L.; LIAO, C.; TRULLY, J. G.; BOVÉ, J. M.; MOUCHES, C.; ROSE, D. L.; COAN, M. E.; CLARK, T. B. *Spiroplasma kunkelii* sp. Nov.: characterization of the etiological agent of corn stunt disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 170-178, 1986.

Capítulo 13

Época de semeadura do milho e incidência de doenças causadas por mollicutes

Antônio Marcos Coelho | Elena Charlotte Landau | Elizabeth de Oliveira Sabato



Introdução

Sendo cultivado praticamente em todo o território nacional, e em diferentes épocas de semeadura, o milho no Brasil apresenta uma distribuição espacial e temporal bastante significativa. Na safra 2014/2015, a área cultivada foi de 15,74 milhões de hectares, e a produção, de 84,73 milhões de toneladas de grãos (MILHO, 2015). Entretanto, a exemplo do que ocorreu com a formação do “Cinturão do milho” nos Estados Unidos, verifica-se também no Brasil a concentração do cultivo desse cereal na região geoeconômica Centro-Sul, a qual, atualmente, responde por 77,5% da área cultivada e por 87,2% da produção. As áreas de cultivo de milho no Brasil variam entre 50 m até mais do que 1.000 m de altitude, sendo mais comum em altitudes entre 500 m e 1.000 m (PEIXOTO, 2010).

Uma importante mudança na evolução da cultura do milho, a partir do início da década de 1990, foi sua substituição pelo cultivo da soja, em função de melhor rentabilidade econômica que esta última vem apresentando. Tendo a soja como a principal cultura no verão, o produtor tem preferido semear o milho em sucessão, no cultivo denominado de “milho safrinha” ou “segunda safra”. Este sistema de produção tem predominado nos Estados do Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo a segunda safra maior que a primeira, desde meados da década de 1990 (TSUNECHIRO; FERREIRA, 1996).

A segunda safra de milho vem ganhando cada vez mais importância, com grande destaque para o Mato Grosso. Essa intensificação do cultivo de milho em segunda safra é uma mudança espaço-temporal na produção, cujo desenvolvimento tecnológico passa a ter grande responsabilidade por este novo cenário (PEIXOTO, 2010). No ano agrícola 2000/2001, a produção de milho na segunda safra foi responsável por 15,3% da safra total do cereal, ao passo que no agrícola 2014/2015 esta participação saltou para aproximadamente 60%. Há dez anos, poucas eram as empresas de sementes que acreditavam no crescimento significativo de milho na segunda safra, em virtude do alto risco climático para a cultura, havendo necessidade de desenvolvimento de cultivares adaptadas a essas condições. Com os expressivos crescimentos de produtividade observados, principalmente na região Centro-Oeste do Brasil, a safrinha passou a ter suma importância sobre o abastecimento de milho.

Entretanto, neste ambiente de cultivos intensivos, os aspectos relacionados à incidência de pragas e doenças têm assumido grande importância para a cultura do milho, destacando-se os enfezamentos, doenças cujos agentes causais são transmitidos pela cigarrinha *Dalbulus maidis*. O enfezamento-pálido e o enfezamento-vermelho são causados, respectivamente, por *Spiroplasma kunkelii*, e pelo *Mayze bushy stunt phytoplasma* (MBS-fitoplasma). Esses patógenos, denominados mollicutes (classe Mollicutes), têm como hospedeiros o milho e a cigarrinha *D. maidis*. São adquiridos em plantas de milho doentes e, após multiplicarem-se no inseto-vetor, em três ou quatro semanas, podem ser transmitidos para plântulas de milho, durante a alimentação das cigarrinhas. Os sintomas e danos dos enfezamentos tornam-se aparentes, em geral, no estágio reprodutivo das plantas, e incluem avermelhamento e/ou clorose das folhas, encurtamento de internódios e espigas pequenas, com grãos chochos ou com poucos grãos (ALIVIZATOS; MARKHAM, 1986; MASSOLA JÚNIOR, 1998;

OLIVEIRA et al., 2013a). Contudo, genótipos de milho suscetíveis a essas doenças, submetidos à inoculação com molicutes e cultivados em vasos, apresentam como primeiros sintomas dos enfezamentos descoloração das folhas do cartucho (NAULT, 1980). Os enfezamentos causam redução severa na produção das plantas de milho e, quando ocorrem em altos níveis de incidência, os prejuízos são expressivos (OLIVEIRA et al., 2002a, 2002b, 2003a, 2003b). Surto epidêmicos de enfezamentos podem atingir muitas lavouras de milho em uma ampla região geográfica (OLIVEIRA et al., 1998). A elucidação de aspectos epidemiológicos dessas doenças e das causas determinantes da ocorrência de surtos epidêmicos pode contribuir para o desenvolvimento de medidas de controle.

Neste capítulo, serão analisados resultados experimentais da avaliação de efeito da época de semeadura na incidência dos enfezamentos em milho, sendo considerada, também, a influência de fatores ambientais. Será apresentado um estudo de caso referente à alta incidência e aos danos causados por essas doenças. O cenário das épocas de semeadura do milho no território nacional será discutido com relação às condições que favorecem a incidência dos enfezamentos. Alternativas para escape dessas doenças, visando minimizar danos, serão consideradas.

Épocas de semeadura: efeitos na incidência dos enfezamentos por molicutes

A incidência de enfezamentos causados por molicutes foi avaliada em experimentos em que um híbrido de milho para produção de grãos (híbrido granífero) e um híbrido de milho-pipoca foram semeados em diferentes épocas, durante dois anos consecutivos, em três áreas localizadas na Estação Experimental da Embrapa Milho e Sorgo (Figura 1), no município de Sete Lagoas, MG (19°28'S, 44°15'W, ~732 m de altitude). A distância entre essas áreas é superior a 1.000 m. A área 3 esteve sempre circundada apenas por vegetação de gramínea nativa, existindo, nas imediações das áreas 1 e 2, cultivos de milho, em diferentes estádios de desenvolvimento e em quantidades variáveis.

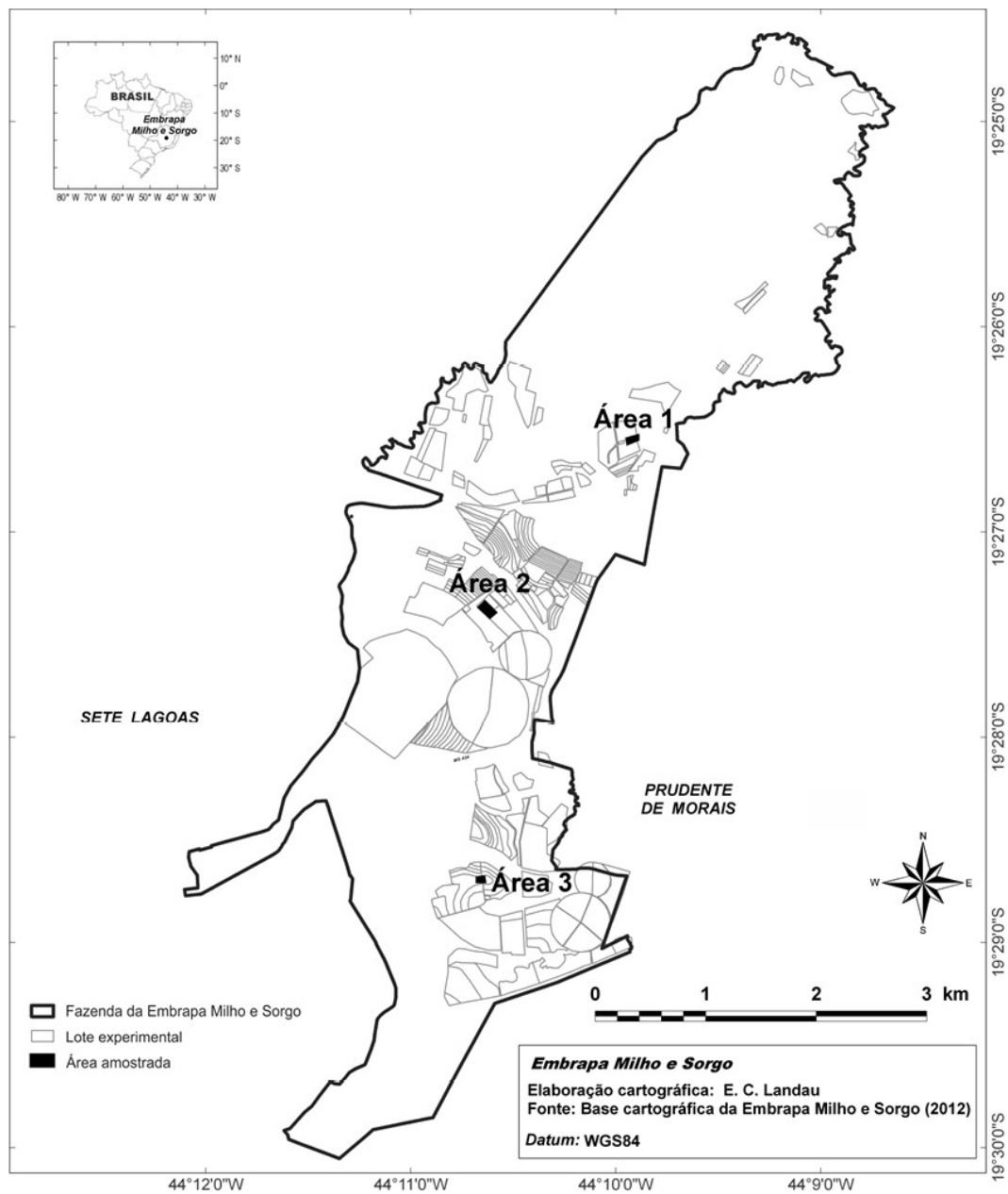


Figura 1. Mapa da Estação Experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, e localização das áreas utilizadas no experimento. Distância entre as áreas 1 e 2 = 1.600 m; distância entre as áreas 2 e 3 = 1.050 m; e distância entre áreas 1 e 3 = 2.650 m.

Amostragens da população da cigarrinha *D. maidis* presentes nessas áreas foram feitas aos 40 dias após a semeadura do milho. Os insetos foram coletados com rede entomológica, tendo sido realizadas três coletas em cada genótipo de milho. Cada coleta foi feita por 30 movimentos da rede entomológica entre duas fileiras de plantas, ao longo de 10 m. Os insetos foram colocados em sacos de plástico, mortos por congelamento, contados e preservados em etanol 70%.

Para cada genótipo foi calculado o número médio de cigarrinhas *D. maidis* coletadas por amostragem.

Aos 90 dias após cada semeadura foi feita a avaliação da incidência de plantas com sintomas de enfezamentos. Essa avaliação foi feita pela contagem do número total de plantas em uma fileira de 10 m e do número de plantas com sintomas de enfezamentos, obtendo-se o percentual de incidência pela fórmula:

Incidência de enfezamentos = n° de plantas com sintomas/ n° total de plantas x 100.

Essa avaliação foi feita em três fileiras espaçadas na área de cada cultivar, sendo calculada a média dos valores obtidos. Amostras de folhas com sintomas característicos de enfezamentos coletadas nessas áreas foram submetidas ao teste de PCR para confirmar a presença de espiroplasma e/ou de fitoplasma nas plantas (LEE et al., 1993; BARROS et al., 2001).

Nos cultivos semeados em fevereiro de 2012, em novembro de 2012 e em abril de 2013, as espigas de dez plantas saudáveis e de dez plantas com sintomas de enfezamento foram cobertas com sacos de papel e coletadas para avaliação da produção de grãos. Essa cobertura foi feita na data da avaliação de sintomas, e a seleção das plantas foi feita sempre aos pares, escolhendo-se primeiro uma planta com sintomas de enfezamento, e depois a planta sem sintomas localizada o mais próximo possível dessa planta. As espigas foram coletadas, debulhadas, sendo determinados o peso de grãos e o conteúdo de umidade, visando ajustar os valores de produtividades por plantas saudáveis e infectadas (g por planta) para um padrão de umidade de 130 g kg^{-1} . A presença de espiroplasma e/ou de fitoplasma em amostras de folhas de plantas com sintomas de enfezamentos foi confirmada nos testes de PCR.

As plantas com sintomas de enfezamentos apresentaram espigas pequenas, em geral com poucos grãos (Figura 2). O resultado da correlação entre o número médio de cigarrinhas e a porcentagem de plantas infectadas, nas três áreas, nas quatro épocas de semeadura, e para os dois genótipos de milho, encontra-se na Figura 3. Foi constatada maior incidência dos enfezamentos nas cultivares de milho granífero e de pipoca quando a semeadura foi realizada nos meses de fevereiro e de abril. Nos cultivos realizados com semeadura nesses meses verificou-se, em média, mais do que o dobro de plantas doentes, em relação aos

cultivos semeados em outubro e em novembro (Tabela 1). Esses dados confirmam resultados de avaliações diversas, em que essas doenças têm sido detectadas em maior incidência em lavouras de milho semeadas tardiamente, em relação a cultivos anteriores desse cereal, em países e em regiões de clima quente que permitem a obtenção de mais de uma safra ao ano.



Figura 2. Espigas de milho granífero (A) e de milho-pipoca (B) colhidas em plantas sem e com sintomas de enfazamento.

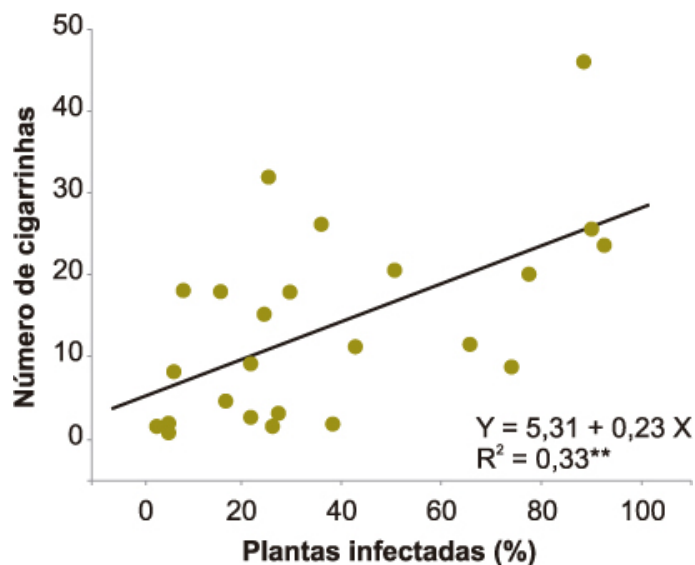


Figura 3. Relação entre a ocorrência de cigarrinhas *D. maidis* e a proporção de plantas com enfezamentos.

No Brasil, essas doenças predominam no milho safrinha, em relação ao milho da safra de verão (OLIVEIRA et al., 2003b), e surtos epidêmicos podem ocorrer em lavouras semeadas ao final do mês de novembro ou em dezembro (OLIVEIRA et al., 1998). Temperaturas médias elevadas (em torno de 27 °C a 30 °C durante o dia, e 17 °C a 20 °C durante a noite) são condições que favorecem essas doenças (OLIVEIRA et al., 2007) que, em geral, ocorrem nessas épocas. O inseto-vetor e os mollicutes podem se multiplicar nos cultivos de milho anteriores, e se concentrar nas lavouras de milho semeadas tardiamente. É importante observar que as semeaduras realizadas em fevereiro e em abril são tardias, e confirmam maior incidência dos enfezamentos em relação às épocas de semeadura em outubro e em novembro.

Observa-se que o dano dessas doenças na produção das plantas de milho é severo, atingindo mais de 70% de redução no peso dos grãos (Figura 2, Tabela 2). O nível de dano na produção de uma lavoura desse cereal será, portanto, dependente e diretamente proporcional ao nível de incidência de enfezamentos, ou seja, do percentual de plantas doentes.

Tabela 1. Efeito do ambiente, da época de semeadura e de cultivares, na incidência de plantas de milho com enfezamento.

Época (mês/ano)	Genótipo de milho	Porcentagem de plantas infectadas com enfezamento (%)			
		Planta infectada (%)			
		Área 1	Área 2	Área 3	Média
Fev./2012	Pipoca	66	77	74	72
	Híbrido	22	25	16	21
Nov./2012	Pipoca	43	51	26	40
	Híbrido	6	8	5	7
Abr./2013	Pipoca	92	88	38	73
	Híbrido	30	36	17	27
Out./2013	Pipoca	27	22	90	46
	Híbrido	6	3	25	11
Média		36a	39a	36a	37
CV (%)		16	22	15	19

Médias na mesma linha, seguidas de letras iguais, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Turkey a 5%.

Tabela 2. Produção de grãos de plantas de milho sadias e com enfezamentos.

Época (mês/ano)	Genótipo de milho	Peso de grãos das plantas de milho (g/planta)					
		Área 1		Área 2		Área 3	
		PGPS ⁽¹⁾	PGPI ⁽²⁾	PGPS	PGPI	PGPS	PGPI
Fev./2012	Pipoca	62,33	16,06	37,10	10,72	44,74	21,74
	Híbrido	220,14	27,66	157,84	49,81	138,58	43,00
Nov./2012	Pipoca	55,20	17,27	54,91	27,05	75,42	26,19
	Híbrido	130,62	11,00	147,00	11,26	179,70	31,92
Abr./2013	Pipoca	32,15	10,08	37,10	14,82	54,13	18,83
	Híbrido	96,32	26,09	135,00	22,93	163,14	67,52
Média		99,47ab	18,03B	93,12b	22,78B	109,29a	34,87A
CV %		9,00	19,65	6,38	15,34	15,36	26,02

⁽¹⁾PGPS: produção de grãos de plantas de milho sadias; ⁽²⁾PGPI: produção de grãos de plantas infectadas. Médias seguidas de mesma letra para as plantas de milho sadias (PGPS), e minúsculas para plantas infectadas não apresentam diferenças significativas pelo teste de Turkey, a 5%.

Influência da cultivar de milho

O nível de resistência genética influenciou a incidência de enfezamento. Observa-se diferença marcante entre a incidência de enfezamento nas cultivares de milho granífero e de milho-pipoca (Tabela 1). Essa diferença evidencia maior resistência genética da cultivar de milho para produção de grãos. Diversos estudos mostram variação na resistência de genótipos de milho quanto aos enfezamentos causados por mollicutes, sendo essa resistência predominantemente de efeito aditivo, embora existam também genes com efeito de dominância (SILVA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2013b).

Influência da quantidade do inseto-vetor

Entre os fatores que influenciam a incidência dos enfezamentos em uma área ou região, destaca-se o número de cigarrinhas infectantes com mollicutes que se alimentam nas plântulas de milho nos estádios iniciais de desenvolvimento.

Verificou-se correlação positiva entre o número médio de cigarrinhas coletadas nas cultivares de milho granífero e pipoca, aos 40 dias da semeadura, nas três áreas, nas quatro épocas, e os níveis de incidência de enfezamento detectados (Figura 3). Contudo, embora se possa esperar relação direta e positiva entre o número de cigarrinhas que se alimentam nas plântulas de milho e o número de cigarrinhas infectantes com os agentes causais dos enfezamentos, essa expectativa pode ser frustrada, dependendo da proveniência desse inseto-vetor, e pode ser influenciada pela presença de milho no entorno. O nível de resistência e a incidência de enfezamentos no milho de onde provêm as cigarrinhas podem afetar a incidência de cigarrinhas infectantes. Por outro lado, a idade do milho no entorno pode influenciar o fluxo migratório da cigarrinha para a área em questão. Sendo o cartucho da plântula de milho o habitat preferencial dessa cigarrinha, os insetos migram, preferencialmente, de plantas adultas para plântulas recém-geminadas, sendo essa migração influenciada pela presença de plântulas e plantas em diferentes estádios de desenvolvimento, no entorno da área considerada, e por fatores climáticos, que também afetam diretamente esse inseto-vetor.

A relação entre o número de cigarrinhas e a incidência de plantas infectadas (Figura 3), embora significativa, não foi alta, e, nesse caso, explicou apenas 33%

da ocorrência de plantas infectadas, sendo indicativo de que outros fatores são também responsáveis pelos níveis de incidência dessa doença, como: o número de cigarrinhas infectantes na área, o clima, as características do entorno, além do nível de resistência do cultivar.

Influência do entorno

Para a avaliação da influência potencial da paisagem do entorno sobre a frequência de cigarrinhas amostradas, foram consideradas duas características da paisagem do entorno:

1. A existência de áreas cultivadas com milho contíguas às áreas experimentais amostradas, nas diferentes épocas de semeadura (fevereiro, novembro, abril e outubro) nas datas de amostragem das cigarrinhas.
2. A área total cultivada com milho num raio de até 5 km em torno dessas áreas amostradas.

Não foi visualizada relação direta entre o número de cigarrinhas *D. maidis* coletadas nas áreas experimentais (Figura 1) e a extensão e intensidade das áreas cultivadas com milho, contíguas e adjacentes às áreas experimentais (Figura 4, Tabela 3).

Por outro lado, a área cultivada com milho num raio de 5 km em torno das áreas amostradas apresentou relação direta com a incidência de enfezamentos, observando-se uma maior área total cultivada com milho no entorno nas épocas de semeadura em que foram detectadas maiores incidências de enfezamentos (Figura 4, Tabela 3).



Figura 4. Presença de milho em torno das áreas experimentais amostradas, nas épocas avaliadas, em Sete Lagoas, MG.

Tabela 3. Avaliação da ocorrência de plantios de milho em torno das áreas amostradas nas épocas de semeadura das áreas experimentais em Sete Lagoas, MG.

Época	Área	Plantio de milho contíguo?	Número médio de cigarrinhas	Incidência média de enfezamentos (%)
1 (Fev./2012)	1	Sim	31,5	43,80
	2	Sim	53,5	51,08
	3	Não	40,5	45,00
2 (Nov./2012)	1	Sim	29,5	24,68
	2	Não	58,5	29,62
	3	Não	4,0	15,83
3 (Abr./2013)	1	Sim	62,5	61,17
	2	Sim	108,5	62,30
	3	Não	10,0	27,55
4 (Out./2013)	1	Não	7,5	16,48
	2	Sim	6,5	12,58
	3	Não	86,5	57,70

É importante observar, contudo, que neste estudo de ecologia da paisagem não foi considerado o estágio de desenvolvimento dos plantios de milho no entorno, embora seja fato conhecido que a cigarrinha *D. maidis* migra preferencialmente de plantas adultas para plântulas, por ser o cartucho da plântula de milho o seu habitat preferencial.

A condução futura de experimentos específicos para estudos acurados da ecologia da paisagem no entorno de áreas cultivadas com milho, considerando a idade das plantas, poderá proporcionar maior compreensão da epidemiologia desse inseto-vetor e dos mollicutes, e contribuir para desenvolvimento de alternativas para o manejo dos enfezamentos.

Influência do clima

Foi avaliada a relação entre a quantidade de cigarrinhas *D. maidis* coletadas nas áreas experimentais, nas diferentes épocas de semeadura, e as condições climáticas no período prévio às amostragens (Figura 5). Foi observada relação

inversa entre a quantidade de cigarrinhas coletadas e a ocorrência de temperaturas mínimas médias entre 15 °C e 20 °C nos 10 dias anteriores às coletas (Figuras 5 e 6). Efeito semelhante foi observado também para a variação da temperatura média (Figura 5). Não foi detectada qualquer relação entre a quantidade de cigarrinhas amostradas e a variação de outros fatores climáticos.

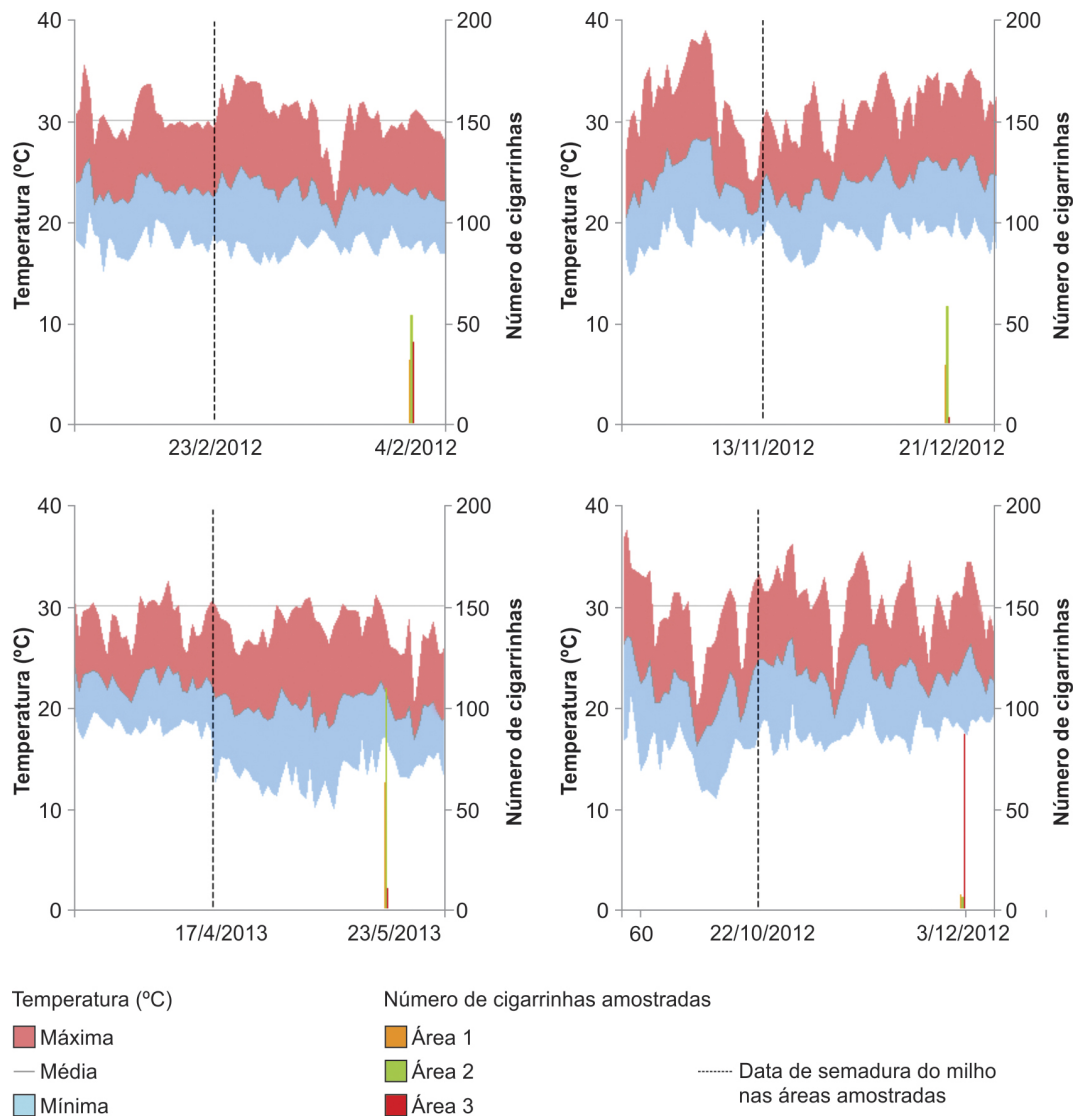


Figura 5. Variação da temperatura diária entre o período prévio à semeadura e 50 dias após a semeadura de milho nas quatro épocas dos experimentos. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

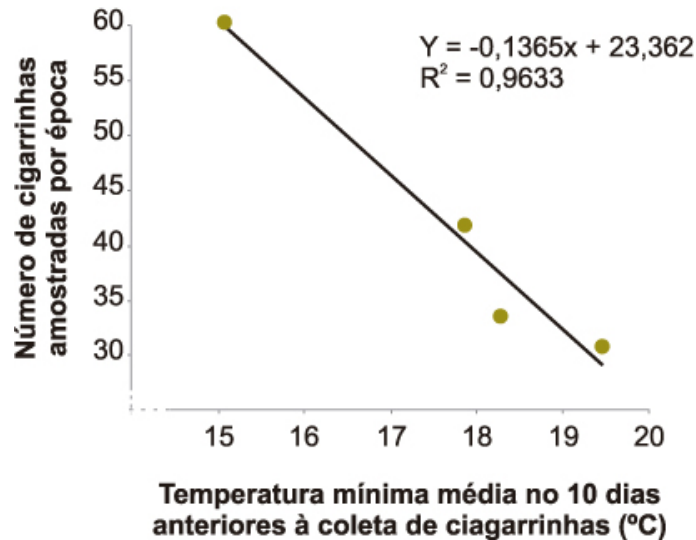


Figura 6. Relação entre a ocorrência de cigarrinhas *D. maidis* e a temperatura mínima diária registrada nos 10 dias anteriores à coleta (40 dias após semeadura).

Embora sejam conhecidos efeitos de diferentes condições de temperatura sobre o ciclo reprodutivo, longevidade e atividade migratória da cigarrinha *D. maidis* (ver [Capítulo 9](#)) não foi possível explicar a relação inversa entre a temperatura e a quantidade de cigarrinhas coletadas, detectada neste estudo. Possivelmente, outros estudos, de longo prazo, poderão contribuir para um melhor entendimento da influência do clima sobre a densidade populacional dessa espécie de cigarrinha e a incidência de enfezamentos.

Épocas de semeadura: efeitos dos enfezamentos na nutrição das plantas e na produtividade de milho

Experimentos com o objetivo de avaliar a eficiência agronômica de fontes de fósforo e de potássio de liberação lenta, revestidas com polímero orgânico, comparadas a fontes convencionais desses nutrientes, vêm sendo conduzidos no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, desde 2008. Entretanto, em um dos anos agrícolas em que os experimentos foram conduzidos, foi constatado e quantificado o efeito acentuado da incidência de enfezamentos causados pelos mollicutes transmitidos pela cigarrinha *D. maidis*, no desenvolvimento e na produtividade do milho (Figuras 7 e 8).



Figura 7. Aspectos das plantas de milho saudáveis e com enfezamento nos experimentos de eficiência agrônômica de fontes de fósforo e de potássio de liberação lenta. Milho saudável ano agrícola 2010/2011

Fotos: Antônio Marcos Coelho. Fotos: Antônio Marcos Coelho. (A); milho doente ano agrícola 2011/2012 (B).

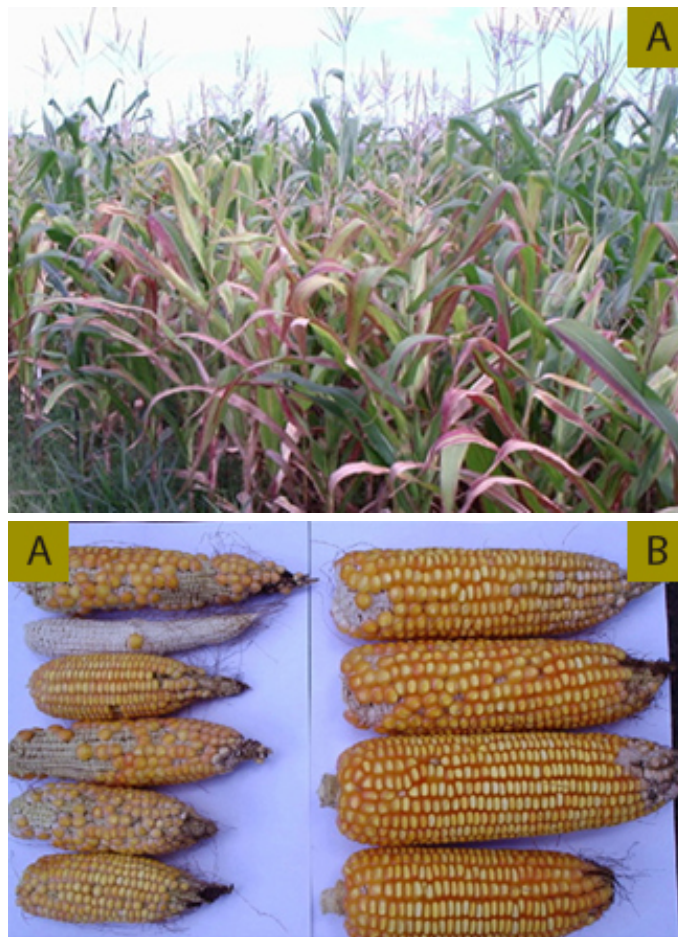


Figura 8. Aspectos das plantas (A); espigas de milho com enfezamento (B); e sadias (C). Ano agrícola 2011/2012.

Fotos: Antônio Marcos Coelho.

No ano agrícola 2010/2011, em semeadura realizada em 22/12/2010, sem a ocorrência da doença, foram observadas respostas acentuadas do milho às doses de P e K aplicadas (Figuras 9 e 10), com produtividades máximas de 8,0 t a 9,0 t de grãos/ha. Por outro lado, no ano agrícola seguinte (2011/2012) em semeadura realizada em 25/11/2011, quando foi observada alta incidência dos enfezamentos no milho dessa área experimental, houve acentuada redução (100%) na produtividade de grãos, sem respostas significativas às doses de P e K aplicadas. Nesta condição, as produtividades máximas de grãos obtidas foram ao redor de 3,0 t/ha (Figuras 9 e 10). Observou-se, no entanto, que embora a incidência de doença tenha causado acentuada redução na produtividade de grãos, as doses de K proporcionaram um pequeno incremento na produtividade da ordem de 11 kg de grãos/kg de K_2O aplicado, fato que não ocorreu no experimento com doses de P, indicando, assim, o efeito do K na tolerância das

plantas de milho a incidência da doença (Figuras 9 e 10). Sem a ocorrência de doença, as doses de P e K proporcionaram incrementos de produtividade de 27 kg e 67 kg de grãos por kg de P_2O_5 e K_2O aplicados, respectivamente (Figuras 9 e 10). Vale ressaltar que, em ambos os anos de condução dessas pesquisas, os experimentos receberam irrigação suplementar, o que invalida qualquer hipótese de possível ocorrência de deficiência hídrica afetando a produtividade do milho.

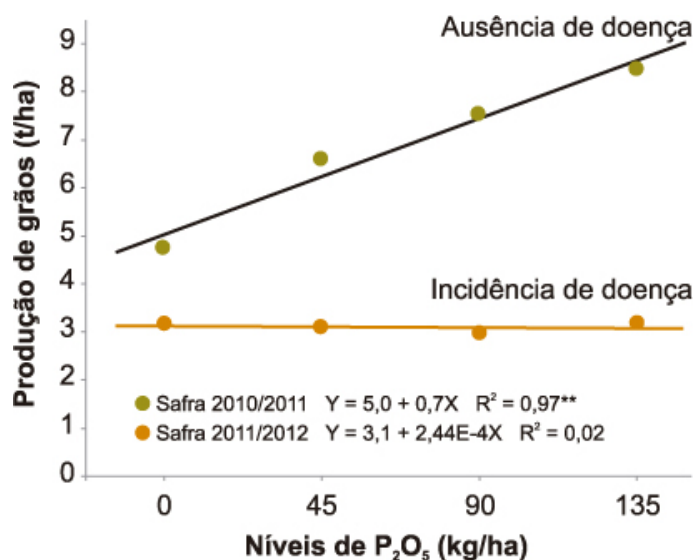


Figura 9. Efeito da incidência de enfazamento nas respostas do milho às doses de P, em anos sem e com a ocorrência da doença.

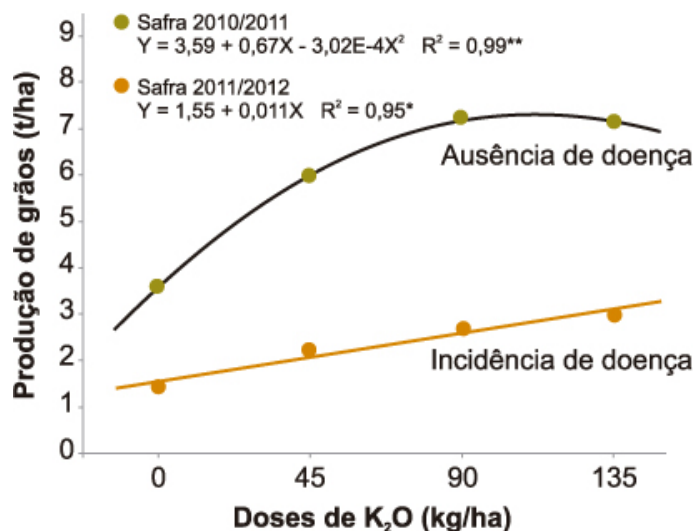


Figura 10. Efeito da incidência de enfazamento nas respostas do milho às doses de K em anos sem e com a ocorrência da doença.

Com relação aos componentes de produção do milho nos experimentos com fósforo e potássio conduzidos nos anos agrícolas 2010/2011 e 2011/2012 (Tabela 4), observa-se que no ano agrícola (2011/2012) em que ocorreu a incidência da doença, com alto índice de espigas doentes, as espigas sadias representaram valores inferiores a 50% do total de espigas colhidas. Verifica-se ainda, à semelhança do que ocorreu para a produção de grãos, que o K aumentou significativamente a porcentagem de espigas sadias, o que não ocorreu para as doses de P aplicadas (Tabela 4).

Tabela 4. Número de plantas, de espigas totais e sadias obtidas nos experimentos de avaliação de fontes de fósforo e potássio de liberação lenta. Ano Agrícola 2010/2011 e 2011/2012.

Ano agrícola	Dose de P ₂ O ₅ e K ₂ O (kg/ha)	Experimento de fósforo			Experimento de potássio		
		Número de plantas (1.000/ha)	Número de espigas (1.000/ha)	Espiga sadia (%)	Número de plantas (1.000/ha)	Número de espigas (1.000/ha)	Espiga sadia (%)
2010/2011	0	66,07	66,07	-	68,15	61,60	-
	45	72,02	74,40	-	61,31	60,12	-
	90	61,60	65,18	-	60,71	61,01	-
	135	66,70	68,15	-	70,83	69,05	-
	Média	67,48	69,46	-	64,22	62,97	-
	CV (%)	11,00	11,07	-	9,42	10,80	-
2011/2012	0	60,12	51,19	44,38	57,76	41,07	15,74
	45	57,74	45,84	42,30	55,95	47,92	50,12
	90	55,36	50,89	34,16	52,09	53,87	34,88
	135	55,36	53,57	34,16	55,06	55,44	48,14
	Média	56,21	48,55	39,74	56,13	50,33	36,13
	CV (%)	7,71	12,63	39,90	8,20	18,87	28,17

Nota: No ano agrícola 2010/2011 não ocorreu doença.

Cenário das épocas de semeadura do milho no Brasil

Os artigos sobre áreas de concentração (LANDAU et al., 2012b) e distribuição espaço-temporal da cultura do milho no Brasil (LANDAU et al., 2012a) fornecem informações importantes da complexidade da distribuição espacial e temporal deste cereal no território brasileiro. Os dados da Tabela 5, extraídos da CONAB (MILHO, 2015), mostram o calendário de semeadura do milho na primeira e segunda safras, nas diferentes regiões do Brasil e, na Tabela 6, as épocas climaticamente aptas para a semeadura de milho, nas diferentes regiões do Brasil, de acordo com o zoneamento agrícola (BRASIL, 2015).

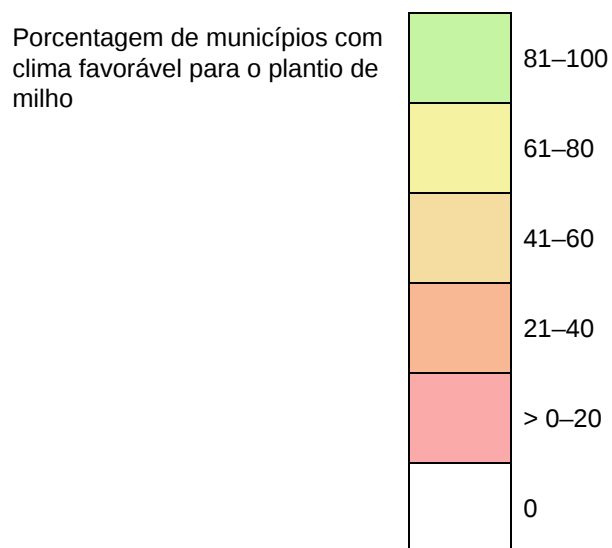
Tabela 5. Calendário de semeadura de milho na primeira e segunda safra nas diferentes regiões do Brasil.

Safras	Região	Período											
		Inverno (21/Jun. a 22/Set.)			Primavera (23/Set. a 20/Dez.)			Verão (21/Dez. a 20/Mar.)			Outono (21/Mar. a 20/Jun.)		
		Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.
1ª	Norte	P	P		P	P	P	P	P				P
	Nordeste				P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Centro-Oeste				P	P	P						
	Sudeste				P	P	P						
	Sul		P	P	P	P	P						
2ª	Norte						P	P	P	P	P	P	P
	Nordeste						P	P	P	P	P	P	P
	Centro-Oeste						P	P	P				
	Sudeste						P	P	P				
	Sul						P	P	P				

Fonte: adaptado de Milho (2015).

Tabela 6. Épocas climaticamente aptas para a semeadura de milho nas diferentes regiões do Brasil de acordo com o zoneamento agrícola.

Safr	Região	Mês											
		Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai	Jun.
1 ^a	Norte			16	46	50	50	39					
	Nordeste				17	24	34	47	45	28	28	27	12
	Centro-Oeste			46	99	99	99						
	Sudeste			31	87	86	67						
	Sul	11	55	93	98	99	100	63	13				
2 ^a	Norte							11	11	3			
	Nordeste												
	Centro-Oeste						90	90					
	Sudeste						73	44	3				
	Sul						23	17	6				



Fonte: Zoneamento agrícola para a safra de milho 2014/2015 (BRASIL, 2015).

Apesar de a produção de milho ocorrer em praticamente todos os municípios brasileiros, existem áreas de maior concentração da atividade, situadas, na sua maioria, entre os paralelos 10° e 30° Sul e meridianos 45° e 60° Oeste. Mais do que 3/4 da produção nacional de milho concentra-se em menos do que 1/6 do território brasileiro. Nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste predominam a

semeadura da safra de verão, e na região Centro-Oeste, a semeadura de milho na segunda época, após a semeadura de verão, geralmente, da cultura da soja (LANDAU et al., 2012b).

Os resultados apresentados e discutidos nos tópicos anteriores deste capítulo levam à indicação de que a diversidade de épocas de semeadura do milho pode intensificar e acentuar a incidência das doenças cujos agentes causais são transmitidos pela cigarrinha *D. maidis*. Essa cigarrinha migra para sobreviver e, por isso, sobreposições do ciclo do milho favorecem a incidência e perpetuação desse inseto e dos patógenos que transmite.

Considerações finais

Os danos causados pela incidência de enfezamentos, cujos agentes causais são transmitidos pela cigarrinha *D. maidis*, na cultura do milho, são consideráveis. Redução na produtividade da ordem de 100% tem sido observada em experimentos e em lavouras comerciais de milho, em várias regiões do Brasil. Acredita-se que, entre outros fatores, a intensificação das épocas de semeadura da cultura no Brasil vem contribuindo para o aumento na intensidade dessas doenças. Assim, práticas de manejo, como cultivares tolerantes e semeadura em condições em que não haja sobreposição de lavouras de milho em diferentes estádios de desenvolvimento, podem permitir o escape à alta incidência dos enfezamentos e contribuir para amenizar ou mesmo evitar prejuízos por essas doenças.

Referências

ALIVIZATOS, A. S.; MARKHAM, P. G. Acquisition and transmission of corn stunt spiroplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals of Applied Biology**, v. 108, p. 535-544, 1986.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portarias de Zoneamento Agrícola de Risco Climático por Unidade da Federação**. Brasília, DF, 2015. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/zoneamento-agricola/portarias-segmentadas-por-uf>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

LANDAU, E. C.; CRUZ, R. K. M. da; HIRSCH, A.; GUIMARÃES, D. P.; SOARES, G. R. **Perfil espaço-temporal da produção de milho no Brasil entre 1999 e 2010**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012a. 55 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 55).

LANDAU, E. C.; HIRSCH, A.; CRUZ, J. C.; DUARTE, J. de O.; GARCIA, J. C.; GARAGORRY, E. L. **Áreas de concentração da produção de milho no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012b. 21 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 58).

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

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

MILHO. **Acompanhamento da Safra Brasileira [de] Grãos**: safra 2014/15: décimo segundo levantamento, Brasília, DF, v. 2, n. 12, p. 83-97, set. 2015. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_11_08_57_48_boletim_graos_setembro_2015.pdf>. Acesso em: 19 out. 2015.

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

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R.; NAULT, L. R. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off season in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 147, n. 2, p. 141-153, 2013a.

OLIVEIRA, E.; CARVALHO, R. V.; DUARTE, A. P.; ANDRADE, R. A.; RESENDE, R. O.; OLIVEIRA, C. M.; RECO, P. C. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 2, p. 38-46, 2002a.

OLIVEIRA, E.; GAMA, E. E. G.; TEIXEIRA, F. F.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, A. R. Genetic control of maize resistance to corn stunt spiroplasma. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 3, n. 2, p. 68-71, 2013b.

OLIVEIRA, E.; MAGALHÃES, P. C.; GOMIDE, R. L.; VASCONCELOS, C. A.; SOUZA, I. R. P.; CRUZ, I.; SHAFERT, R. Growth and nutrition of mollicute infected maize. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 945-949, 2002b.

OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, A. C. Incidência de Enfezamento e de (*Maize Rayado Fino Virus* – mrfv) em milho em diferentes épocas de plantio e relação entre a expressão de sintomas foliares dos Enfezamentos e produção. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 3, p. 221-224, jul./set. 2003a.

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O.; GIMÉNEZ PECCI, M. L. P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Ocorrência e perdas causadas por mollicutes e vírus na cultura do milho safrinha no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 19-25, jan. 2003b.

OLIVEIRA, E.; SANTOS, J. C.; MAGALHÃES, P. C.; CRUZ, I. Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affected by spiroplasma acquisition and environmental conditions. **Bulletin of Insectology**, v. 60, n. 2, p. 229-230, 2007.

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, W. E. Enfezamento pálido e enfezamento vermelho na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 45-47, 1998.

PEIXOTO, C. de M. Avanços tecnológicos da cultura do milho no Brasil. Portal do Campo. **Portal Dia de Campo**, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em:

<[http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?](http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=23562&secao=Sementes%20e%20Mudas)

[id=23562&secao=Sementes%20e%20Mudas](http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=23562&secao=Sementes%20e%20Mudas)>. Acesso em: 14 out. 2014.

SILVA, R. G.; Galvão, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; OLIVEIRA, E. Identificação de níveis e fontes de resistência aos enfezamentos do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, p. 18-20, 2002.

TSUNECHIRO, A.; FERREIRA, C. R. R. P. T. Aspectos econômicos da adubação do milho no Brasil. **Informações Econômicas**, v. 26, n. 11, p. 21-30, 1996.

Capítulo 14

Viroses na cultura do milho no Brasil

Viviane Talamini | Elizabeth de Oliveira Sabato | Frederico Alberto de Oliveira



Viroses em milho

Em vários países, diversos vírus têm sido detectados infectando o milho. Esses vírus são, em geral, transmitidos por insetos ou por ácaros-vetores, havendo especificidade nas interações entre o vetor, os vírus e a planta. Os insetos e ácaros-vetores adquirem os vírus em plantas de milho, ou em plantas de outra espécie hospedeira gramínea, infectadas, e os transmitem para plântulas de milho

sadias. As formas de transmissão desses vírus por seus vetores são classificadas em não persistente, semipersistente, persistente, em função do período de tempo necessário para sua transmissão, após a aquisição na planta infectada, que pode ocorrer imediatamente e persistir por apenas alguns minutos, durante horas, ou dias, ou ocorrer somente após a multiplicação desse agente infeccioso nos tecidos do vetor (transmissão persistente-propagativa). Essas formas de transmissão dependem do vírus e do vetor em questão. Várias espécies de plantas da família Poaceae, incluindo espécies cultivadas e plantas daninhas, são hospedeiras dos vírus que infectam o milho. Essas espécies desempenham papel importante na epidemiologia desses agentes patogênicos, atuando como reservatório e como fonte de inóculo para sua disseminação na cultura do milho (GORDON et al., 1981; BOS, 1983; THOTTAPPILLY et al., 1993; NAULT, 1997).

Os vírus que atacam caracteristicamente a cultura do milho, em geral, causam danos expressivos no desenvolvimento e na produção das plantas infectadas e, ocorrendo em alta incidência em uma lavoura, causam perdas severas. Esses agentes infecciosos invadem sistemicamente todas as partes da planta infectada e, ao nível celular, afetam sua fisiologia, sendo os danos que causam tanto maior quanto mais precoce o estágio de desenvolvimento em que a planta é infectada (BOS, 1983; WAQUIL et al., 1996; GIMÉNEZ PECCI et al., 2012). As viroses do milho podem ser identificadas com base nos sintomas foliares, e para confirmação do diagnóstico visual, os vírus podem ser detectados nos tecidos da planta infectada, principalmente por microscopia eletrônica, por testes sorológicos e por testes RT-PCR (KITAJIMA, 1979; SHUKLA et al., 1994; HAMMOND et al., 1997; MELO, 2000).

No Brasil, três viroses têm sido detectadas no milho, sendo comumente denominadas: mosaico-comum (causada por *Sugarcane mosaic virus* – SCMV), risca (causada por *Maize rayado fino virus* – MRFV) e faixa-clorótica-das-nervuras (causada por *Maize mosaic virus* – MMV), (COSTA et al., 1971; KITAJIMA, 1979; ALMEIDA et al., 2000; MELO, 2000; GONÇALVES et al., 2007; SOUZA et al., 2012).

Neste capítulo, são abordados aspectos da ocorrência, sintomas, disseminação, e alternativas para controle das viroses do milho, no Brasil.

Mosaico-comum

Essa virose foi relatada no milho, no Brasil, na década de 1970, com denominação mosaico-comum, sendo causada por estirpe de vírus do grupo do mosaico-da-cana-de-açúcar (COSTA et al., 1971). Trata-se de uma virose causada por vírus do grupo potyvírus, que ocorre em muitas espécies vegetais da família Poaceae, tendo ampla distribuição geográfica no mundo. Atualmente, através de técnicas sorológicas e moleculares, têm sido descritas várias espécies desses vírus, incluídas no gênero *Potyvirus*. Essas espécies de vírus podem infectar mais de uma espécie hospedeira cultivada, sendo impossível fazer distinções entre elas com base apenas nos sintomas que causam nas plantas e na gama de hospedeiros. É comum encontrar na literatura referência a esses vírus em espécies gramíneas cultivadas, como “complexo de vírus do mosaico” (SHUKLA et al., 1994; GONÇALVES et al., 2012).

A virose mosaico-comum é relatada no milho em todo o continente americano e, no Brasil, ocorre em várias áreas produtoras das

regiões Sudeste e Centro-Oeste, com maior frequência no milho da safra de verão semeado tardiamente (novembro e dezembro) e no milho safrinha (janeiro e fevereiro) (COSTA et al., 1971; GORDON et al., 1981; ALMEIDA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002a, 2002b).

Etiologia

No Brasil, tem sido confirmado que o mosaico-comum do milho é causado por uma estirpe do *Sugarcane mosaic virus*, embora a presença desse vírus não tenha sido confirmada em algumas amostras de folhas de milho com sintomas dessa virose, sugerindo possível presença de outra espécie (ALMEIDA et al., 2000; MELO, 2000; OLIVEIRA et al., 2008; GONÇALVES et al., 2011; SOUZA et al., 2012).

Em diversos países, incluindo Austrália, Estados Unidos e China, tem sido demonstrado que sintomas de mosaico podem ser causados por espécies de *Potyvirus* que podem infectar plantas de milho, sorgo, cana-de-açúcar, capim-maçambará (Johnsongrass), *Pennisetum centrasiticum*, e outras espécies de plantas daninhas da família Poaceae, sendo esses vírus denominados *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), *Pennisetum mosaic virus* (PenMV), *Zea mosaic virus* (ZeMV). Esses vírus, e suas estirpes, anteriormente referidos apenas como pertencentes ao grupo potyvírus, atualmente pertencem à família Potyviridae, gênero *Potyvirus*. Os *Potyvirus* apresentam partículas alongadas, e flexuosas, com cerca de 750 nm de comprimento e 13 nm de largura (SHUKLA et al., 1994; FAN et al., 2003).

Sintomas e efeitos no desenvolvimento e na produção da planta de milho

Os sintomas do mosaico-comum são, em geral, observados nas plântulas de milho, no campo, cerca de 15 dias após a emergência, sendo possível detectar os primeiros sintomas em plântulas, 1 semana após a inoculação. Nas folhas, são observadas áreas cloróticas entremeadas com áreas verdes, em padrão de mosaico (Figura 1). Esses sintomas podem estar presentes em todas as folhas e também nas bainhas foliares e na palha das espigas de plantas adultas. Contudo, com o crescimento das plantas infectadas, os sintomas de mosaico tendem a desaparecer, limitando seu reconhecimento. As plantas doentes apresentam encurtamento dos internódios e redução em altura. As espigas tornam-se pequenas, e podem apresentar falhas na formação dos grãos (SABATO et al., 2013). Quanto mais jovem a plântula de milho for infectada pelo vírus maiores serão os danos na produção (SHUKLA et al., 1994; ALMEIDA et al., 2000, 2001). A comparação da produção média entre 25 plantas com sintomas do mosaico-comum e 37 plantas sem sintomas, de um híbrido comercial de milho cultivado em campo, mostrou redução no peso de grãos da ordem de 47%, causada por esta virose (WAQUIL et al., 1996).



Figura 1. Sintomas da virose mosaico-comum no milho

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Transmissão e epidemiologia

A transmissão dos vírus que causam o mosaico-comum, no milho, em condições naturais, é feita de maneira não persistente, por mais de 20 espécies de afídeos, sendo o principal, entre esses insetos-vetores, o pulgão-do-milho *Rhopalosiphum maidis* (Fitch.) (Hemiptera: Aphididae), em razão da sua eficiência na transmissão. As espécies de pulgões *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) também são importantes vetores dos vírus do mosaico-comum. Os pulgões são polípagos, e realizam picadas de prova em diferentes espécies vegetais. Quando se alimentam de uma planta infectada adquirem o vírus, e durante várias horas ou dias podem

transmiti-lo para plantas saudáveis, caracterizando a forma não persistente ou semipersistente de transmissão. A transmissão desses vírus também pode ser feita mecanicamente. Mais de 250 espécies de gramíneas são hospedeiras dos vírus do mosaico-comum do milho (GORDON et al., 1981; SHURTLEFF, 1989; SHUKLA et al., 1994; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2004; GIMÉNEZ PECCI et al., 2012).

Diferentes espécies de plantas da família Poaceae são hospedeiras dos vírus do mosaico-comum, fator que interfere na incidência dessa virose nas lavouras de milho. Esses vírus infectam espécies de gramíneas que são plantas espontâneas nos cultivos de milho no Brasil, por exemplo, o capim-colchão (*Digitaria* spp.), o capim-pé-de-galinha (*Cynodon dactylon*) e o capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*) (ALMEIDA et al., 2000, 2001). Essas gramíneas, quando infectadas, podem servir de reservatório do vírus para infecções de novas lavouras por causa da característica de polifagia dos pulgões. Outros hospedeiros desses vírus, como o capim-maçambará (*Sorghum halepense*) e o sorgo, também podem servir de reservatório e de fonte de inóculo (SHUKLA et al., 1994).

Controle

Essa virose pode ser controlada utilizando-se cultivares de milho com resistência genética. A existência de genes associados à resistência ao SCMV em genótipos de milho do Brasil tem sido demonstrada (SOUZA et al., 2008), sendo assim possível o desenvolvimento de cultivares com resistência genética a esse vírus. No processo de seleção para essa resistência é importante considerar a grande variabilidade genética dos potyvírus (SHUKLA

et al., 1994) e ampliar o máximo possível a exposição dos genótipos de milho ao inóculo proveniente de diferentes ambientes.

A eliminação das plantas daninhas com sintomas do mosaico-comum, eventualmente presentes na área em que se pretende semear o milho, que podem servir de fonte de inóculo, é uma medida que pode contribuir para reduzir a incidência dessa doença na lavoura.

Risca

Essa é uma das mais importantes doenças de etiologia viral do milho, no Brasil, e nas Américas. Sua ocorrência é reportada do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com especial importância para países da América Central e do Sul. A gama de hospedeiros dessa virose está restrita a gramíneas e, além do milho, os teossintos, *Tripsacum* spp., e *Rottboellia exaltata*, são outros hospedeiros conhecidos (GÁMEZ, 1980; KOGEL et al., 1996; GIMÉNEZ PECCI et al., 2012).

Etiologia

Essa virose tem como agente etiológico o *Maize rayado fino virus* (MRFV). MRFV pertence ao gênero *Marafivirus* da família *Tymoviridae*, e suas partículas têm forma isométrica ou poliédrica, com cerca de 31 nm de diâmetro, e genoma formado por RNA. Suas partículas são restritas ao floema das plantas infectadas (KITAJIMA, 1979; GÁMEZ, 1980, 2015).

A comparação entre um isolado do MRFV do Brasil com outros de países da América Latina permitiu verificar grande similaridade

molecular entre todos os isolados estudados. A maior homologia de aminoácidos foi verificada com um isolado desse vírus da Costa Rica (95,7%) e a maior homologia de nucleotídeos, com um isolado do Peru (95,7%) (MELO et al., 2000).

Sintomatologia e efeitos no desenvolvimento e na produção da planta de milho

Os sintomas dessa virose nas plântulas de milho ocorrem entre 8 e 14 dias após a inoculação. Os sintomas iniciais consistem na ocorrência de pontos cloróticos, manchas, ou linhas-curtas, distribuídas, de forma uniforme, na parte superior de folhas jovens, e, geralmente, nas nervuras secundárias e terciárias (Figura 2). Com o passar do tempo os pontos tornam-se mais numerosos e coalescem, ao longo das nervuras, formando riscas com mais de 10 cm de comprimento. Essas riscas são facilmente observadas quando as folhas são colocadas contra a luz do sol. Esses sintomas são mais pronunciados nas folhas de plântulas de milho em estádios iniciais de desenvolvimento, mas podem também ser observados nas folhas das plantas adultas (GÁMEZ, 1980; SABATO et al., 2013). As perdas na produção do milho por causa da ocorrência dessa virose variam de 10% a 100%, a depender do ambiente, do estádio em que a planta é infectada e das características genéticas do hospedeiro (MORA; VÁSQUEZ, 2007; SHURTLEFF, 1989; ZAMBRANO et al., 2014; GÁMEZ, 2015). Há relatos de perdas de até 43% na produção do milho em alguns países da América Central (DE LEON, 2004).



Figura 2. Sintomas da virose risca em milho.

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Transmissão e epidemiologia

MRFV é um vírus transmitido pela cigarrinha *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae). Estudos realizados na Costa Rica, em condições de 20 °C ou 25 °C mostraram que esse inseto-vetor adquiriu o MRFV alimentando--se de plantas infectadas por períodos de 6 a 8h, e passou a transmiti-lo após período de incubação entre 8 e 37 dias, sendo essa transmissão intermitente, e decrescente em função do tempo, e a retenção da infectividade do inseto foi variável entre 1 e 20 dias. Embora o MRFV seja transmitido de maneira semelhante à dos vírus que se multiplicam no inseto-vetor, faltam evidências de sua multiplicação nos tecidos da cigarrinha *D. maidis* (GÁMEZ, 1973, 1980).

Com relação à transmissão, não foi verificada eficiência da inoculação do vírus a partir da seiva de plantas doentes em plantas saudáveis. Também não ocorre transmissão desse vírus por sementes de milho (GÁMEZ, 1980, 2015).

O inseto-vetor do MRFV, a cigarrinha *D. maidis*, migra a longas distâncias (OLIVEIRA et al., 2002a). Assim, a incidência e a severidade da virose causada por MRFV são influenciadas pelo grau de suscetibilidade da cultivar, pela população de cigarrinhas coincidente com as fases iniciais de desenvolvimento da lavoura de milho, pela presença de fontes de inóculo do vírus, e pelas condições climáticas. Em Sete Lagoas-MG, o MRFV foi observado em níveis de maior incidência no milho semeado nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro e março, sendo essa incidência diretamente correlacionada aos maiores níveis de umidade relativa do ar (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003).

Controle

O controle dessa virose pode ser obtido através do desenvolvimento e utilização de cultivares de milho com resistência genética. Há evidências de resistência genética ao MRFV em germoplasma de milho (BUSTAMANTE et al., 1998).

Faixa-clorótica-das-nervuras

No mundo, essa virose ocorre em áreas tropicais e subtropicais, incluindo os estados do Havaí e da Flórida, nos Estados Unidos, países da América Central e do Sul, África e Ásia (GORDON et al., 1981; SHURTLEFF, 1989; THOTTAPPILLY et al., 1993).

No Brasil, a faixa-clorótica-das-nervuras encontra-se relatada no milho em São Paulo, em Manaus, e no Distrito Federal (COSTA et al., 1971; KITAJIMA; VAN DER PAHLEN, 1977) ocorrendo, nesses dois últimos locais, em milho-doce e em uma variedade de milho para produção de grão, sempre em níveis de incidência considerados de pouca importância econômica. Foi observada uma vez em algumas plantas de milho-pipoca, em Sete Lagoas, MG, porém, não tem sido encontrada no milho cultivado nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (OLIVEIRA et al., 2002b, 2003).

Etiologia

A faixa-clorótica-das-nervuras é causada por *Maize mosaic virus* (MMV), um Rhabdovirus. As partículas baciliformes desse vírus medem 225 nm x 90 nm, em preparações “leaf dip”, e 248 nm x 48 nm em seções ultrafinas, ao microscópio eletrônico de transmissão (COSTA et al., 1971; KITAJIMA, 1979; GORDON et al., 1981).

Sintomatologia e efeitos no desenvolvimento da planta de milho

As plantas de milho infectadas por esse vírus apresentam acentuado nanismo, e epinastia, e as folhas apresentam faixas cloróticas descontínuas ao longo das nervuras (Figura 3). Essa planta curvada, com folhas retorcidas e acentuado nanismo, em geral, não produz espiga, torna-se improdutivo e, assim, a perda na lavoura de milho, causada por essa virose, é diretamente dependente do nível de incidência de plantas infectadas.



Figura 3. Sintomas da virose faixa-clorótica-das-nervuras em milho.

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Transmissão e epidemiologia

A transmissão do vírus agente causal da faixa-clorótica-das-nervuras, em condições naturais, é feita pela cigarrinha *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Hemiptera, Delphacidae), de forma persistente e propagativa, com eficiência em torno de 5% a 42% (FALK; TSAI, 1985). *P. maidis* alimenta-se principalmente nos vasos do floema do milho e adquire o vírus em menos de 15 minutos. O período de incubação do vírus no inseto ocorre de 2 semanas a mais. Após esse período de incubação, o inseto é capaz de transmitir o vírus por várias semanas (SHURTLEFF, 1989). Partículas do vírus foram detectadas em diversas partes da cigarrinha *P. maidis*, como

glândulas salivares, gânglios nervosos, músculo da perna, intestino, traqueia, epiderme e tecidos conjuntivos (AMMAR; NAULT, 1985).

Na planta, o período de incubação do vírus varia entre 4 e 30 dias. Esse vírus ocorre também em espécies Poaceae plantas daninhas, como *Setaria vulpiseta* e *Rottboellia exaltata*, e foi experimentalmente transmitido para teossinto (*Zea mays mexicana*) e para sorgo (GORDON et al., 1981).

Controle

Na literatura, há carência de informações sobre o controle dessa virose no milho, porém, assim como para outras viroses desse cereal, certamente pode-se obter controle eficiente através do desenvolvimento e da utilização de cultivares com resistência genética.

Referências

ALMEIDA, A. C. L.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O. Detecção de vírus por RT-PCR, hibridização "Dot-blot" e "Dot-ELISA" em milho com mosaico comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 168-174, 2000.

ALMEIDA, A. C. L.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. Fatores relacionados à incidência e disseminação do vírus do mosaico comum do milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 766-769, 2001.

AMMAR, E. D.; NAULT, L. R. Assembly and accumulation sites of maize mosaic virus in its planthopper vector. **Intervirolgy**, v. 24, n. 1, p. 33-41, 1985.

BOS, L. **Introduction to plant virology**. New York: Longman, 1983. 160 p.

BUSTAMANTE, P. I.; HAMMOND, R.; RAMIREZ, P. Evaluation of maize germ plasm for resistance to maize rayado fino virus. **Plant Disease**, v. 82, n. 1, p. 51-56, 1998.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma no milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, n. 4, p. 39-41, 1971.

DE LEON, C. **Maize diseases**: a guide for field identification. 4th ed. Mexico: CIMMYT, 2004. 119 p.

FALK, B. W.; TSAI, J. H. Serological detection and evidence for multiplication of maize mosaic virus in the planthopper, *Peregrinus maidis*. **Phytopathology**, v. 75, n. 7, p. 852-855, 1985.

FAN, Z.; CHEN, S. C.; DENG, C.; WANG, W.; LIANG, X.; LI, H. Molecular characterization of a distinct potyvirus from whitegrass in China. **Archives of Virology**, v. 148, p. 1219-1224, 2003.

GÁMEZ, R. **Description of plant viroses**: maize rayado fino vírus. Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=220>>. Acesso em: 17 abr. 2015.

GÁMEZ, R. **Maize rayado fino vírus**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute: Association of Applied Biologists, 1980. (CMI/AAB. Descriptions of plant viruses, 220).

GÁMEZ, R. Transmission of rayado fino virus of maize (*Zea mays*) by *Dalbulus maidis*. **Annals of Applied Biology**, v. 73, n. 3, p. 285-292, 1973.

GIMÉNEZ PECCI, M. P.; LAGUNA, I. G.; LENARDON, S. **Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina**. Buenos Aires: INTA, 2012. 208 p.

GONÇALVES, M. C.; GALDEANO, D. M.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M. Variabilidade genética de Sugarcane mosaic virus causando mosaico em milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 362-369, 2011.

GONÇALVES, M. C.; MAIA, I. G.; GALLETI, S. R.; FANTIN, G. M. Infecção mista pelo sugarcane mosaic virus e maize rayado fino virus provoca danos na cultura do milho no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 348-352, 2007.

GONÇALVES, M. C.; PINTO, L. R.; SOUZA, S. C.; LANDELL, M. G. A. Virus diseases of sugarcane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 108-116, 2012.

GORDON, D. T.; KNOKE, J. K.; SCOTT, G. E. **Virus and viruslike diseases of maize in the United States**. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1981. 210 p.

HAMMOND, R. W.; KOGEL, R.; RAMIREZ, P. Variability of geographically distinct isolates of maize rayado fino virus in Latin America. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 12, p. 3153-3159, 1997.

KITAJIMA, W. E. Citopatologia e localização de vírus de milho e de leguminosas alimentícias nas plantas infectadas e nos vectores. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 241-254, 1979.

KITAJIMA, W. E.; VAN DER PAHLEN, A. Ocorrência do vírus da faixa clorótica das nervuras do milho no Distrito Federal e em Manaus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 2, p. 83-84, 1977.

KOGEL, R.; HAMMOND, R. W.; RAMIREZ, P. Incidence and geographic distribution of maize rayado fino virus (MRFV) in Latin America. **Plant Disease**, v. 80, p. 679-683, 1996.

MELO, P. R. **Estudo da variabilidade e do uso de métodos moleculares na detecção dos vírus do rayado fino e do mosaico-comum-do-milho (*Zea mays* L.)**. 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

MELO, P. R.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O. Caracterização molecular de um isolado brasileiro do *Maize rayado fino* virus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 444, 2000. Suplemento.

MORA, E.; VÁSQUEZ, J. Incidence of and yield loss caused by maize rayado fino virus in maize cultivars in Ecuador. **Euphytica**, v. 153, p. 339-342, 2007.

NAULT, L. R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 90, n. 5, p. 521-541, 1997.

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

OLIVEIRA, E. de; RESENDE, R. O.; PECCI, M. P. G.; LAGUNA I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n.1, p. 19-25, 2003.

OLIVEIRA, E.; CARVALHO, R. V.; DUARTE, A. P.; ANDRADE, A. R. A.; RESENDE, R. O.; OLIVEIRA, C. M.; RECCO, P. C. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 2, p. 38-46, 2002b.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, A. C. Incidência de enfezamentos e de Maize Rayado Fino Virus em milho em diferentes épocas de plantio e relação entre expressão dos sintomas foliares dos enfezamentos e produção. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 3, p. 221-224, 2003.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. de (Ed.). **Doenças em milho**: mollicutes, vírus, vetores, mancha por *Phaeosphaeria*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 276 p.

OLIVEIRA, E.; SOUZA, I. R. P.; ALVES, E.; OLIVEIRA, C. M. Ocorrência de espécies de Potyvirus em milho, no Brasil. **Summa Phytopathologica**, n. 34, p. S96, 2008. Trabalho apresentado no 31º Congresso Paulista de Fitopatologia, 2008, Campinas.

SABATO, E. O.; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T. **Identificação e controle de doenças do milho**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2013. 145 p.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A.A. **The Potyviridae**. Cambridge: CAB International, 1994. 516 p.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn diseases**. 2nd ed. St. Paul: APS, 1989. 105 p.

SOUZA, I. R. P. de; GIOLITTI, F.; CARNEIRO, N. P.; LENARDON, S. L.; OLIVEIRA, E. de; GOMES, E. A.; NODA, R. W.; SOUZA, F. A. de. Sequence diversity in coat protein of SCMV infecting maize and sorghum in Brazil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 11, n. 2, p. 120-136, 2012.

SOUZA, I. R. P.; SCHUELTER, R.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; OLIVEIRA, E.; REDINBAUGH, M. Mapping QTL contributing to SCMV resistance in tropical maize. **Hereditas**, v. 145, p. 167-173, 2008.

THOTTAPPILLY, G.; BOSQUE-PEREZ N. A.; ROSSEL, H. W. Viruses and virus diseases of maize Tropical Africa. **Plant Pathology**, v. 42, p. 494-509, 1993.

WAQUIL, J. M.; OLIVEIRA, E.; PINTO, N. F. A.; FERNANDES, F. T.; CORREA, L. A. Efeito na produção e incidência de viroses em híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 460-463, 1996.

ZAMBRANO, J. L.; JONES, M. W.; FRANCIS, D. M.; TOMAS, A.; REDINBAUGH, M. G. Quantitative trait loci for resistance to Maize Rayado Fino Virus. **Molecular Breeding**, v. 34, p. 989-996, 2014.

Capítulo 15

Detecção molecular e identificação de espécies de potyvírus do mosaico-comum em milho e sorgo

Isabel Regina Prazeres de Souza | Beatriz de Almeida Barros



Introdução

O grupo dos potyvírus é o maior e mais importante grupo de vírus de plantas (MATTHEWS, 1982). Seis espécies de *Potyvirus* têm sido identificadas no mundo, causando sintomas de mosaico em uma variedade de culturas de grãos e de gramíneas, incluindo:

Sugarcane mosaic virus (SCMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) (SHUKLA et al., 1994), *Zea mosaic virus* (ZeMV) (SEIFERS et al., 2000), e *Pennisetum mosaic virus* (PenMV) (DENG et al., 2008). No Brasil, estudos demonstram que o SCMV é o agente causal do mosaico-comum em milho, em sorgo (MELO, 2000; RESENDE et al., 2004; GONÇALVES et al., 2011; SOUZA et al., 2012a, 2012b) e em cana-de-açúcar (GONÇALVES et al., 2007a).

O *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) e o *Maize rayado fino virus* (MRFV) são os principais vírus que infectam o milho no Brasil (GONÇALVES et al., 2007a). O aumento da área plantada associado ao cultivo na safrinha (segunda safra, geralmente semeada nos meses de janeiro a março), tem ampliado o período de permanência do milho em campo. Esse sistema de produção contribui para o aumento da incidência do mosaico-comum, e da manutenção do inóculo viral no ambiente (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000). Outro aspecto importante é que o SCMV incide também em outras gramíneas cultivadas, como a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (GONÇALVES et al., 2007b, 2011; BARBOZA et al., 2008) e o sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (ESPEJEL et al., 2006), além de infectar várias outras espécies, como os capins massambará e colômbio (ALMEIDA et al., 2000; SOUZA et al., 2014). O SCMV prevalece na China e na Europa, e o MDMV na parte sul do *Corn Belt* dos Estados Unidos (LOUIE et al., 1990; KUNTZE et al., 1995).

Os sintomas do mosaico-comum podem ser facilmente identificados em plantas de milho jovens e tendem a desaparecer quando as plantas atingem a maturidade. Nas folhas formam--se áreas cloróticas entremeadas com áreas verdes, em padrão de mosaico (COSTA et al., 1971; KITAJIMA, 1979; ALMEIDA et al., 2000). Em

sorgo, o SCMV pode provocar o aparecimento de dois sintomas, o mosaico típico e o sintoma necrótico, dependendo da cultivar (KIMATI et al., 2005). No necrótico, aparecem áreas necrosadas de cor avermelhada ou amarelada nas folhas, dependendo da cultivar infectada. Esses tipos de sintomas, na maioria das vezes, levam a planta do sorgo à morte, principalmente quando a infecção ocorre prematuramente (CASELA et al., 2008). Os potyvírus são transmitidos de maneira não persistente por vários afídeos, e o vetor mais eficiente na cultura do milho é o *Rhopalosiphum maidis* L. (Hemiptera: Aphididae) (EDWARDSON; CHRISTIE, 1991). Os pulgões são polípagos e, geralmente, realizam picadas de prova em diferentes espécies vegetais. Ao se alimentarem de uma planta infectada, adquirem o vírus e, durante várias horas ou dias, podem transmiti-lo para plantas saudáveis, de forma não persistente, ou semipersistente (HARRISON; ROBINSON, 1988; SHUKLA et al., 1994).

Os vírus do gênero *Potyvirus* possuem partículas flexuosas não envelopadas, com comprimento variando entre 680 nm e 900 nm e diâmetro entre 11 nm e 15 nm. Essas partículas são constituídas de aproximadamente 2.000 unidades de uma única proteína estrutural circundando a molécula de RNA (RIECHMANN et al., 1992). O genoma dos potyvírus é constituído de uma fita simples de RNA (ssRNA) com, aproximadamente, 10.000 nucleotídeos, que é poliadenilada, senso-positiva, e é traduzida em uma poliproteína precursora (DOUGHERTY; CARRINGTON, 1988). Esta poliproteína tem peso molecular entre 340 kDa e 368 kDa e é clivada em 10 proteínas funcionais (RIECHMANN et al., 1992).

A proteína capsidial (PC) dos potyvírus tem sido caracterizada e dividida em três domínios: N e C-terminais, que são expostos na

superfície da partícula, e o domínio central, o qual é conservado e não variável como os domínios N e C (SHUKLA et al., 1991). Shukla e Ward (1988) verificaram que a proteína capsidial apresentava características exclusivas do grupo dos potyvírus, indicando que qualquer esquema de classificação baseado nas propriedades dessa proteína poderia ser apropriado para a diferenciação de membros dentro do grupo dos potyvírus, ao invés daqueles baseados nas propriedades de outro produto gênico. O sequenciamento da proteína capsidial dos potyvírus tem sido de importância e utilização em estudos de taxonomia e evolução (SHUKLA et al., 1991; RIECHMANN e al., 1992) e na discriminação e na reconstrução de relações filogenéticas entre potyvírus (RYBICKI; SHUKLA, 1992).

A estirpe de SCMV que infecta o milho no Brasil foi inicialmente identificada por Melo (2000). Posteriormente, Souza et al. (2012a, 2012b) demonstraram, por meio do sequenciamento do gene da capa proteica de isolados de SCMV, que se tratava de uma nova estirpe. A detecção molecular dessa estirpe distinta tem sido realizada por meio da amplificação do gene da capa proteica utilizando os *primers* descritos por Melo (2000). A aplicação da técnica de sorologia na identificação de potyvírus apresenta, com frequência, reações cruzadas e resultados não conclusivos, em razão da utilização de anticorpos policlonais (SHUKLA et al., 1994; SOUZA et al., 2012b). Entretanto, isso pode ser contornado quando se utiliza o sequenciamento da região do genoma viral que codifica a proteína capsidial para classificação hierárquica de potyvírus (SHUKLA; WARD, 1989).

A utilização das técnicas de RT-PCR e PCR para detecção e identificação dos seis potyvírus do complexo do mosaico-comum é

descrita neste capítulo empregando-se *primers*, específicos para a amplificação de sequências da proteína capsidial.

Detecção molecular dos potyvírus do complexo mosaico-comum

Para as análises, o tecido utilizado deve ser folhas de gramíneas sintomáticas para o mosaico-comum, as quais não podem estar secas ou em senescência. Como controle negativo são utilizadas folhas de plantas saudáveis. Entre as coletas de cada amostra, os utensílios utilizados para cortar o tecido vegetal devem ser previamente limpos com produtos comerciais que promovam a degradação de RNA para evitar contaminação cruzada entre as amostras. O tecido vegetal coletado deve ser imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer a -80 °C até a extração de RNA ou, imediatamente também após a coleta, pode ser preservado em solução de estabilização de RNA, disponível comercialmente.

Primers específicos para a detecção molecular dos potyvírus capazes de infectar e causar sintomas de mosaico em gramíneas foram selecionados da literatura e são apresentados na Tabela 1. Para serem utilizadas como controles positivos, sequências referentes a cada um dos seis potyvírus do complexo do mosaico foram selecionadas em bancos de dados públicos – *GenBank*. Fragmentos de até 500 pb foram sintetizados (Tabela 2), e *primers* específicos de cada sequência foram desenhados.

Tabela 1. Primers utilizados em RT-PCR para detecção dos potyvírus do complexo do mosaico.

Potyvírus	Identificação do primer	Sequencia 5'-3'(1)	Referência
SCMV, SrMV, MDMV, e JGMV	PSR ⁽³⁾	CAGCTGTGTGBCKSTCTGTATT	Jiang e Zhou (2002)
SCMV	PSCF ⁽²⁾	GGTAGTGGTACAGGAACAAGA	Jiang e Zhou (2002)
MDMV	P MDF ⁽²⁾	TGACGAAATTATAGATGTAA	Jiang e Zhou (2002)
SrMV	PSrF ⁽²⁾	AGGATGAATTAATTGACGTGC	Jiang e Zhou (2002)
JGMV	PJG ⁽²⁾	AAACCAGCTAGTGGTGAAGGC	Jiang e Zhou (2002)
Potyvírus em geral	PZEO1 ⁽⁴⁾ PZEO2 ⁽⁵⁾	GTATGGTGCATCGAAAATGGT TGCTGCTGCTTTCATCTG	Seifers et al. (2000)
PenMV	PPenF PPenR	GGNAAYAAAYAGYGGNCARCC CGACTGCAGGATCCAAGC(T) ₁₈	Fan et al. (2003)
SCMV	SCMVF4	GTTTTYACCAAGCTGGAACAGTC	Alegria et al. (2003)
SCMV	SCMVR3	AGCTGTGTGTCTCTGTATTCTC	Yang e Mirkov (1997)
SCMV	SCMVNI2	GARGCATGGGGATA	Gonçalves et al. (2011)
JGMV	JG5' JG3'	AGAGATGTACAAGAACGCCATCGC CATCCTTTAACGTCAGATCGACGG	Lenardon e Giolitti (2004)
SCMV (Arg)	SC5'	TTACAACGAAGATGTTTTCC	Giolitti et

MDMV (Arg)	SC3'	CTGAAATAGTAAATACGAGG	al. (2005)
	MD5'	ACGACAATTCTTTGACGATCTTCC	Lenardon e Giolitti (2004)
	MD3'	CCTCACTCACTTGCAGACATAGTAGG	
SCMV (Brasil)	MDMV2 ⁽⁶⁾	GTATTCCATCAGTCGGGAACTG	Melo (2000)
	MDMV3 ⁽⁶⁾	ACGAGGTAAAACCTCAC	Resende et al. (2004)

⁽¹⁾ B = (G, C ou T); K = (G ou T); S = (G ou C); N = (A, G, C ou T); Y = (C ou T); R = (A ou G).

⁽²⁾ *Primers diretos* específicos para determinado potyvírus.

⁽³⁾ *Primer reverso* comum para todos os potyvírus.

⁽⁴⁾ *Primer direto* que corresponde ao domínio conservado da proteína capsidial, MVWCIENG.

⁽⁵⁾ *Primer reverso* que corresponde ao domínio conservado da proteína capsidial, QMKAAA.

⁽⁶⁾ *Primers* que, embora tenham a denominação de MDMV, foram desenhados para detecção da estirpe brasileira de SCMV infectando milho e outras gramíneas.

Tabela 2. Sequências da proteína capsidial utilizadas como controles positivos para detecção de potyvírus em gramíneas.

Gene	Vírus	Tamanho (pb)	Número de acesso
Controle 1	SCMV	441	S77088
Controle 2	MDMV	451	U07216
Controle 3	SrMV	439	U07219
Controle 4	JGMV	449	U07217
Controle 5	ZeMV	426	AF228693
Controle 6	PenMV	440	AY172336

O RNA total é extraído utilizando-se kit comercial, e quantificado por meio de espectrofotometria. O cDNA é sintetizado a partir de 1,0 ug de RNA total, utilizando-se oligo(dT)₁₈ e transcriptase reversa capaz de transcrever RNAs de até 12 Kb.

As condições das reações para a detecção dos potyvírus foram ajustadas e estão detalhadas nas Tabelas 3 e 4.

Todas as reações são submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v). Após a detecção, a confirmação do potyvírus é feita por meio de sequenciamento. As sequências obtidas são editadas, e tanto as sequências de nucleotídeos como aquelas traduzidas *in silico* para sequências de proteínas são utilizadas para comparações no banco de sequências *GenBank* do NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2016) para confirmação de suas identidades.

Identificação das espécies de potyvírus

No Brasil, apenas o SCMV tem sido identificado causando sintomas de mosaico-comum nas culturas do milho e do sorgo (MELO, 2000; GONÇALVES et al., 2011; SOUZA et al., 2012a, 2012b). Apesar de a metodologia descrita acima ser estabelecida para detecção dos seis potyvírus do complexo do mosaico (MDMV, SrMV, SCMV, JGMV, PenMV e ZeMV), em todas as amostras que avaliamos até o presente momento, somente a estirpe brasileira do SCMV foi detectada. *Primers* utilizados para detecção de MDMV, SrMV, JGMV, PenMV e ZeMV não apresentaram amplificação, sob qualquer condição, o que significa que *Sorghum mosaic virus*

(SrMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), *Zea mosaic virus* (ZeMV) e *Pennisetum mosaic virus* (PenMV) não estavam presentes nas amostras analisadas. Estes resultados confirmaram os obtidos por Melo (2000), Gonçalves et al. (2011) e Souza et al. (2012b, 2013), em que apenas o *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) foi identificado como o agente causal do mosaico-comum em milho e em sorgo.

As Figuras 1 e 3 exemplificam a detecção positiva em algumas amostras. O conjunto de *primers* PZEO, que amplifica um fragmento de 324 pb (Figura 1), foi desenhado para as regiões conservadas da capa proteica de potyvírus em geral (SEIFERS et al., 2000), respectivamente, MVWCIENG de SCMV e QMKAAA de MDMV. Assim, obteve-se amplificação, uma vez que essas sequências flanqueiam a região conservada da proteína capsidial da estirpe brasileira de SCMV (Figura 2).

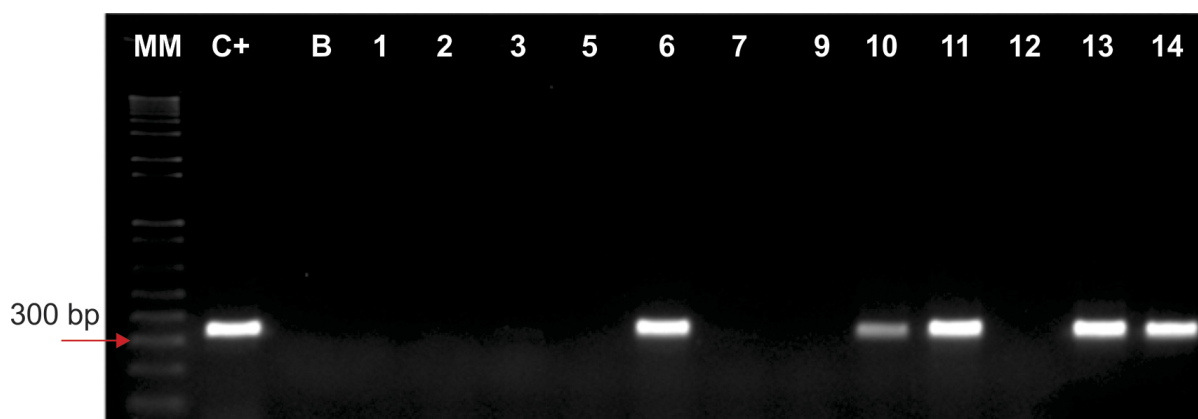


Figura 1. Amplicons resultantes da reação de PCR com o conjunto de *primers* pZEO1 e pZEO2.

VFHQSGTVDAGAQQGGTGNQGATPPTTGGTTGSAAPQTGSGGGTGTGTGATGGQTGAGTGAETGTGAT
GGQAGTGGGTGRTGTGSVGTGATGGQKDKDVDAGTTGTITVPLKAMSKMRLPKAKGKDLHLDFL
LTYKPQQDISNTRATREEFDRWYEAIKKEYEIDDTQMTVVMSSGL**MVWCIENG**CSPNINGSWTMMD
GDEQRFVPLKPIENASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDF
YEMNSRTPARAKEAHM**QMKAAA**VRGSNTRLFGLDGNVGETQENTERHTAGDVSARNMHSLLGVQQHH

Figura 2. Sequência de aminoácidos da proteína capsial da estirpe de SCMV causando mosaico-comum em milho no Brasil, depositada no *GenBank* por Souza et al. (2012b), sob número de acesso DQ315490. Em negrito, verificam-se as mesmas regiões conservadas MVWCIENG e QMKAAA utilizadas por Seifers et al. (2000) para o desenho do conjunto de *primers* PZEO, direto e reverso, respectivamente.

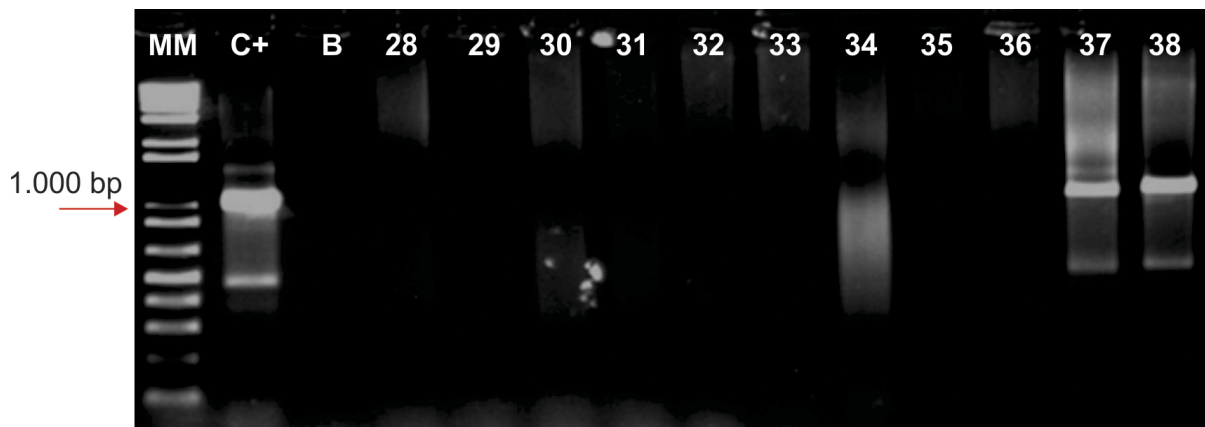


Figura 3. Amplicons da estirpe brasileira de SCMV, obtidos com os *primers* MDMV2 e MDMV3.

Tabela 3. Condições de reação utilizadas com os *primers* pZEO listados na Tabela 1.

Reagente	Concentração final	Condição de ciclagem
cDNA (concentrado)	2,0 uL	
MgCl ₂	1,5 mM	94 °C/2min
Tampão para PCR	1X	94 °C/20 seg
dTNPs	0,2 mM	52 °C/20 seg
pZEO1	0,25 μM	72 °C/30 seg
pZEO2	0,25 μM	72 °C/5 min
Taq DNA Polimerase	1 U	4 °C/∞
H ₂ O	q.s.p para 20 μL	

q.s.p = quantidade suficiente para

Tabela 4. Condições de reação utilizadas para as demais combinações de primers listados na Tabela 1.

Reagente	Concentração final	Condição de ciclagem
cDNA (concentrado)	2,0 uL	
MgCl ₂	1,5 mM	94 °C/2min
Tampão para PCR	1X	94 °C/20 seg
dTNPs	0,2 mM	52 °C/30 seg
Primer F	0,25 μM	72 °C/45 seg
Primer R	0,25 μM	72 °C/5 min
Taq DNA Polimerase	1 U	4 °C/∞
H ₂ O	q.s.p para 20 μL	

Os amplicons obtidos a partir de amplificação com os *primers* PZEO, MDMV-SCMV (Brasil) foram sequenciados. A comparação através de *blastn* realizado contra o GenBank (NCBI) mostrou identidades variando de 95% a 98% e de 99% a 100% quando comparados, respectivamente, com as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína capsidial da estirpe de SCMV (DQ315490) infectando milho no Brasil.

Considerando todas as análises realizadas até o presente momento, os resultados obtidos indicam que todas as amostras sintomáticas estavam infectadas com SCMV, confirmando ser esse o agente causal da virose mosaico-comum em milho e em sorgo, no Brasil.

As condições descritas neste capítulo para as reações de RT-PCR constituem uma ferramenta para detecção rápida de potyvírus infectando gramíneas no Brasil.

Referências

ALEGRIA, O. M.; ROYER, M.; BOUSALEM, M.; CHATENET, M.; PETERSCHMITT, M.; GIRARD, J. C.; ROTT, P. Genetics diversity in the coat protein coding region of eight-six sugarcane mosaic virus isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. **Archives of Virology**, v. 148, n. 2, p. 357-372, 2003.

ALMEIDA, A. C. L.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O. Detecção de vírus por RT-PCR, hibridação “dot-blot” e dot-ELISA em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 168-174, 2000.

BARBOZA, A. A. L.; SOUTO, E. R.; CARNELOSSI, P. R.; MARCUZ, F. S.; MARRAFON, M. A. Propriedades de isolados virais de *Saccharum* spp., causadores de mosaico em cana-de-açúcar no Paraná e São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n.1, p. 109-112, 2008.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; FERNANDES, F. T.; PINTO, N. F. J. A. Doenças: mosaico da cana-de-açúcar (Vírus - “SCMV”). In: RODRIGUES, J. A. S. (Ed.). **Cultivo do**

sorgo. 4. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, 2).

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma no milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, n. 4, p. 39-41, 1971.

DENG, C. L.; WANG, W. J.; WANG, Z. Y.; JIANG, X.; CAO, Y.; ZHOU, T.; WANG, F. R.; LI, H. F.; FAN, Z. F. The genomic sequence and biological properties of Pennisetum mosaic virus, a novel monocot-infecting potyvirus. **Archives of Virology**, v. 153, p. 921-927, 2008.

DOUGHERTY, W. G.; CARRINGTON, J. C. Expression and function of potyviral gene products. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 123-143, 1988.

EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G. **The potyvirus group**. Gainesville: Florida Agricultural Experiment Station, 1991. (Monograph, 16).

ESPEJEL, F.; JEFFERS, D.; NOA-CARRAZANA, J. C.; RUIZ-CASTRO, S.; SILVA-ROSALES, L. Coat protein gene sequence of a Mexican isolate of Sugarcane mosaic virus and its infectivity in maize and sugarcane plants. **Archives of Virology**, v. 151, p. 409-412, 2006.

FAN, Z.; CHEN, H.; CAI, S.; DENG, C.; WANG, W.; LIANG, X.; LI, H. Molecular characterization of a distinct potyvirus from white grass in China. **Archives of Virology**, v. 148, p. 1219-1224, 2003.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 2000. 80 p. (Embrapa-CNPMS. Circular técnica, 26).

GIOLITTI, F.; HERRERA, M. G.; MADARIAGA, M.; LENARDON, S. L. Detection of *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) on maize in Chile. **Maydica**, v. 50, p. 101-104, 2005.

GONÇALVES, M. C.; GALDEANO, D. M.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M. Variabilidade genética de Sugarcane mosaic virus, causando mosaico em milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 346, p. 362-369, 2011.

GONÇALVES, M. C.; MAIA, I. G.; GALLETI, S. R.; FANTIN, G. M. Infecção mista pelo Sugarcane mosaic virus e Maize rayado fino virus provoca danos na cultura do milho no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 348-352, 2007a.

GONÇALVES, M. C.; SANTOS, A. S.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M.; HAKAKAVA, R. Caracterização de um isolado do Sugarcane mosaic virus que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 32-39, 2007b.

HARRISON, B. D.; ROBINSON, D. J. Molecular variation in vector borne plant viruses: epidemiological significance. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 321, p. 447-451, 1988.

- JIANG, J. X.; ZHOU, X. P. Maize dwarf mosaic disease in different regions of China is caused by *Sugarcane mosaic virus*. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2437-2443, 2002.
- KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; RESENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2.
- KITAJIMA, E. W. Citopatologia e localização de vírus do milho e de leguminosas alimentícias nas plantas infectadas e nos vetores. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 241-254, 1979.
- KUNTZE, L.; FUCHS, E.; GRUNTZEG, M.; SCHULZ, B.; HENNING, U.; HOUMANN, F.; MELCHINGER, A. E. Evaluation of maize inbredlines for resistance to sugarcane mosaic virus (SCMV) and maize dwarf mosaic virus (MDMV). **Agronomics**, v. 15, p. 463-467, 1995.
- LENARDON, S. L.; GIOLITTI, F. Maize Argentina mosaic. In: LAPIERRE, H.; SIGNORET, P. A. (Ed.). **Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae)**. Montpellier: INRA, 2004. p. 635-636.
- LOUIE, R.; KNOCK, J. K.; FINDLEY, W. R. Elite maize germplasm: reaction to maize dwarf mosaic and maize chlorotic dwarf viruses. **Crop Science**, v. 30, p. 1210-1215, 1990.
- MATTHEWS, R. E. F. **Classification and nomenclature of viruses**: 4^o Report of the International Committee on Classification of Viruses. Basel: S. Karger, 1982. v. 17, 99 p.
- MELO, P. R. **Estudo da variabilidade e do uso de métodos moleculares na detecção dos vírus do rayado fino e do mosaico comum do milho (Zea mays L.)**. 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 14 set. 2016.
- RESENDE, R. O.; ALMEIDA, A. C. L.; MELO, P. R. Técnicas moleculares para detecção de vírus em milho e em insetos-vetores. In: OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, C. M. de (Ed.). **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores, mancha por Phaeosphaeria**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. p. 206-226.
- RIECHMANN, J. L.; LAIN, S.; GARCIA, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 1-16, 1992.
- RYBICKI, E. P.; SHUKLA, D. D. Coat protein phylogeny and systematics of potyviruses. **Archives of Virology**, v. 5, p. 139-170, 1992. Supplementum.
- SEIFERS, D. L.; SALOMON, R.; MARIE-JEANNE, V.; ALLIOT, B.; SIGNORET, P.; HABER, S.; LOBODA, A.; ENS, W.; SHE, Y. M.; STANDING, K. G. Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel. **Phytopathology**, v. 90, p. 505-513, 2000.
- SHUKLA, D. D.; FRENKEL, M. J.; WARD, C. W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. **Canadian Journal of**

Plant Pathology, v. 13, p. 178-191, 1991.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 2703-2710, 1988.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. **Archives of Virology**, v. 106, p. 171-200, 1989.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Cambridge: CAB International, 1994. 516 p.

SOUZA, I. R. P. de; BARROS, B. de A.; RAFAEL, H. A. **Detecção molecular do SCMV infectando milho e sorgo no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 24 p. il. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 66).

SOUZA, I. R. P. de; CARNEIRO, N. P.; GIOLITTI, F.; LENARDON, S. L.; SABATO, E. de O.; GOMES, E. A.; NODA, R. W.; SOUZA, F. A. de. **Análise do N-terminal da proteína capsial de SCMV infectando milho e sorgo no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012a. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 59).

SOUZA, I. R. P. de; GIOLITTI, F.; CARNEIRO, N. P.; LENARDON, S. L.; OLIVEIRA, E. de; GOMES, E. A.; NODA, R. W.; SOUZA, F. A. de. Sequence diversity in coat protein of SCMV infecting maize and sorghum in Brazil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 11, n. 2, p. 120-136, 2012b.

SOUZA, I. R. P. de; RODRIGUES, J. A. S.; KARAM, D.; BARROS, B. de A. Detecção molecular de potyvirus causador de mosaico em plantas daninhas na cultura do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 30.; SIMPÓSIO SOBRE LEPDÓPTEROS COMUNS A MILHO, SOJA E ALGODÃO, 1., 2014, Salvador. **Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global**: resumos expandidos. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2014. 1 CD-ROM.

YANG, Z. N.; MIRKOV, T. E. Sequence and relationships of sugarcane mosaic and sorghum mosaic virus strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination. **Phytopathology**, v. 87, p. 932-939, 1997.

Capítulo 16

Pulgão vetor de vírus em milho no Brasil

Charles Martins de Oliveira | Marina Regina Frizzas



Introdução

As viroses que ocorrem na cultura do milho limitam a produção em várias regiões do mundo, principalmente no continente americano e na África. Até o momento, três viroses ocorrem na cultura do milho no Brasil: a) mosaico-comum, causado, principalmente, por *Sugarcane mosaic virus* (SCMV); b) risca, causada por *Maize rayado fino virus* (MRFV) e c) faixa-clorótica das nervuras, causada por *Maize mosaic virus* (MMV) (COSTA et al., 1971; KITAJIMA,

1979; ALMEIDA et al., 2000; MELO, 2000; GONÇALVEZ et al., 2007).

Essas doenças, conhecidas desde a década de 1970 (COSTA et al., 1971; KITAJIMA; COSTA, 1972; KITAJIMA et al., 1976; KITAJIMA; VAN DER PAHLEN, 1977; KITAJIMA; COSTA, 1982), ocorriam em baixa frequência. Entretanto, em razão de mudanças ocorridas na cultura do milho, nas últimas décadas, tais como o plantio do milho safrinha e o uso da irrigação, a importância relativa das viroses em milho tem aumentado. A disseminação dessas doenças está condicionada à transmissão de seus agentes causais por insetos-vetores. O conhecimento da bioecologia e do comportamento dos insetos-vetores é essencial para o planejamento das estratégias de manejo dessas viroses.

Neste capítulo, são abordados aspectos relativos a distribuição, plantas hospedeiras, bioecologia e reconhecimento da principal espécie de pulgão inseto-vetor de vírus na cultura do milho, no Brasil.

Os pulgões ou afídeos (Hemiptera: Aphididae) e as cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae e Delphacidae) representam os principais grupos de insetos-vetores de vírus em milho. Entre as espécies de cigarrinhas destacam-se, no Brasil, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wollcott) (Hemiptera: Cicadellidae), (NAULT, 1990; BRADFUTE et al., 1980) e *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Hemiptera: Delphacidae). Informações sobre essas espécies de cigarrinhas estão descritas nos Capítulos 5 e 9 deste livro.

Pulgões

Mais de 20 espécies de pulgões são capazes de transmitir os vírus que causam o mosaico-comum do milho, entretanto, no Brasil, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), conhecido como pulgão-do-milho, é o seu principal vetor. *Rhopalosiphum maidis* é, provavelmente, a mais importante espécie de pulgão que ataca cereais em regiões tropicais do planeta (BLACKMAN; EASTOP, 2007). O mosaico-comum é causado por um complexo de espécies do gênero *Potyvirus*, incluindo *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), *Zea mosaic virus* (ZeMV) e *Pennisetum mosaic virus* (PenMV) (COSTA; KITAJIMA, 1972; SHUKLA et al., 1994; SHEIFERS et al., 2000; DENG et al., 2008). Os vírus associados ao mosaico-comum são transmitidos por *R. maidis*, de forma não persistente e não circulativa.

Embora *R. maidis* seja o principal pulgão em milho no Brasil, ocasionalmente têm-se observado infestações da espécie *R. padi* (L.) em plantas de milho, tanto no campo como em casa de vegetação. Essa espécie já foi apontada como sendo comum em plantios de milho na França (HENRY; DEDRYVER, 1989) e nos Estados Unidos (FENG et al., 1992; PIKE et al., 1997).

Distribuição geográfica e plantas hospedeiras

O pulgão-do-milho tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrado nas regiões tropicais e subtropicais e, até mesmo, em algumas regiões temperadas (BERTI FILHO, 1982; HILL, 1983; BLACKMAN; EASTOP, 1984). O milho é o hospedeiro principal para *R. maidis*, entretanto, esta espécie é polífaga, e pode se alimentar também em espécies como aveia (*Avena sativa* L.), centeio (*Secale cereale* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), trigo (*Triticum aestivum*

L.), sorgo (*Shorgum* spp.) e cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), além de muitas outras gramíneas, incluindo mais de 30 gêneros (SILVA et al., 1968; BERTELS, 1973; HILL, 1983; BLACKMAN; EASTOP, 1984; GALLO et al., 2002; BLACKMAN; EASTOP, 2007).

Aspectos bioecológicos

Exceto por uma população de *R. maidis* que apresenta reprodução sexual, no Paquistão (REMAUDIÈRE; NAUMANN-ETIENNE, 1991), em regiões tropicais essa espécie se reproduz exclusivamente por partenogênese telítoca. Fêmeas ápteras e aladas, sem o concurso de machos, dão origem somente a fêmeas. As fêmeas são vivíparas, ou seja, as ninfas eclodem ainda no interior do corpo materno e posteriormente são depositadas sobre as folhas do hospedeiro (CARTIER, 1957; BLACKMAN; EASTOP, 2007).

Temperatura, umidade do solo, espécie e idade da planta hospedeira são variáveis que influenciam diretamente a taxa de desenvolvimento, o tamanho da progênie e a longevidade dos adultos de pulgões. Por exemplo, estudos sobre a biologia de *R. maidis*, conduzidos no Brasil, mostraram que a duração da fase ninfal variou de 7,6 dias para pulgões criados em plantas de milho com baixa disponibilidade de água no solo (20% da capacidade de campo) a 10,7 dias em plantas com alta disponibilidade de água no solo (100% da capacidade de campo) (MAIA et al., 2006).

Observou-se ainda que os períodos pré-reprodutivos e reprodutivos foram reduzidos nos tratamentos com baixa disponibilidade de água no solo, assim como a longevidade dos adultos, que foi de 14,3 dias, no tratamento com baixa disponibilidade de água no solo, e de 20,5 dias, no tratamento com alta disponibilidade de água no solo (MAIA et al., 2006). Em estudos conduzidos em outros países

observou-se que, em temperaturas em torno de 25 °C, as fêmeas originam aproximadamente 68 ninfas (FOOTT, 1977), o estágio ninfal, que compreende quatro instares, completa-se em sete dias (EL-IBRASHY et al., 1972) e a longevidade dos adultos é de, aproximadamente, 32 dias (FOOTT, 1977).

O pulgão-do-milho possui elevado número de inimigos naturais, incluindo parasitoides e alguns predadores como larvas de sirfídeos, neurópteros e coccinelídeos. Parasitoides desempenham papel particularmente importante no controle biológico desse vetor. A espécie de parasitoide mais comum atacando *R. maidis* é *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (GILSTRAP et al., 1984; FENG et al., 1992; PIKE et al., 1997). Entretanto, muitas outras espécies também são registradas, tais como *Lysiphlebus delhiensis* (Subba Rao e Sharma) (MISHRA; SINGH, 1993), *Aphelinus varipes* (Forester) (ARCHER et al., 1974; GILSTRAP et al., 1984), *Aphidius ervi* Haliday (FENG et al., 1992), *Diaeretiella rapae* (M'Intosh), *Praon* sp. (FENG et al., 1992) e *Praon unicum* Smith (PIKE et al., 1997), além dos hiperparasitoides *Asaphes* sp. e *Pachyneuron* sp. (BERTI FILHO, 1982; FENG et al., 1992).

Reconhecimento

Os adultos de *R. maidis* (Figura 1) apresentam duas formas: alados e ápteros. As formas aladas são diminutas (<1,5 mm), apresentam cabeça, tórax, pernas e antenas escuras, abdome verde-claro e possuem dois pares de asas diáfanas, sendo as anteriores bem maiores que as posteriores; as asas são mantidas verticalmente sobre o corpo, quando em repouso. As formas ápteras medem aproximadamente 1,5 mm a 2,0 mm, têm coloração verde-azulada e apresentam cabeça, pernas e antenas escuras. Ambas as formas

possuem corpo piriforme. O aparelho bucal é do tipo sugador labial trissegmentado e as antenas são filiformes. Na parte posterior do abdome há duas estruturas tubuliformes escuras e lateralmente dispostas, denominadas sifúnculos (Figura 2), e uma terceira estrutura central chamada codícola. Na base de cada sifúnculo existe uma mancha arredondada escura, no abdome. Os insetos dessa espécie apresentam baixa mobilidade, especialmente as formas ápteras que vivem em colônias, principalmente no cartucho das plantas de milho. Quando em grande número, podem se espalhar por outras partes da planta, incluindo o colmo e os órgãos reprodutivos.





Figura 1. Pulgão-do-milho: colônia de *Rhopalosiphum maidis* (A) e adultos ápteros e ninfas de *R. maidis* (B).

Fotos: Charles Martins de Oliveira

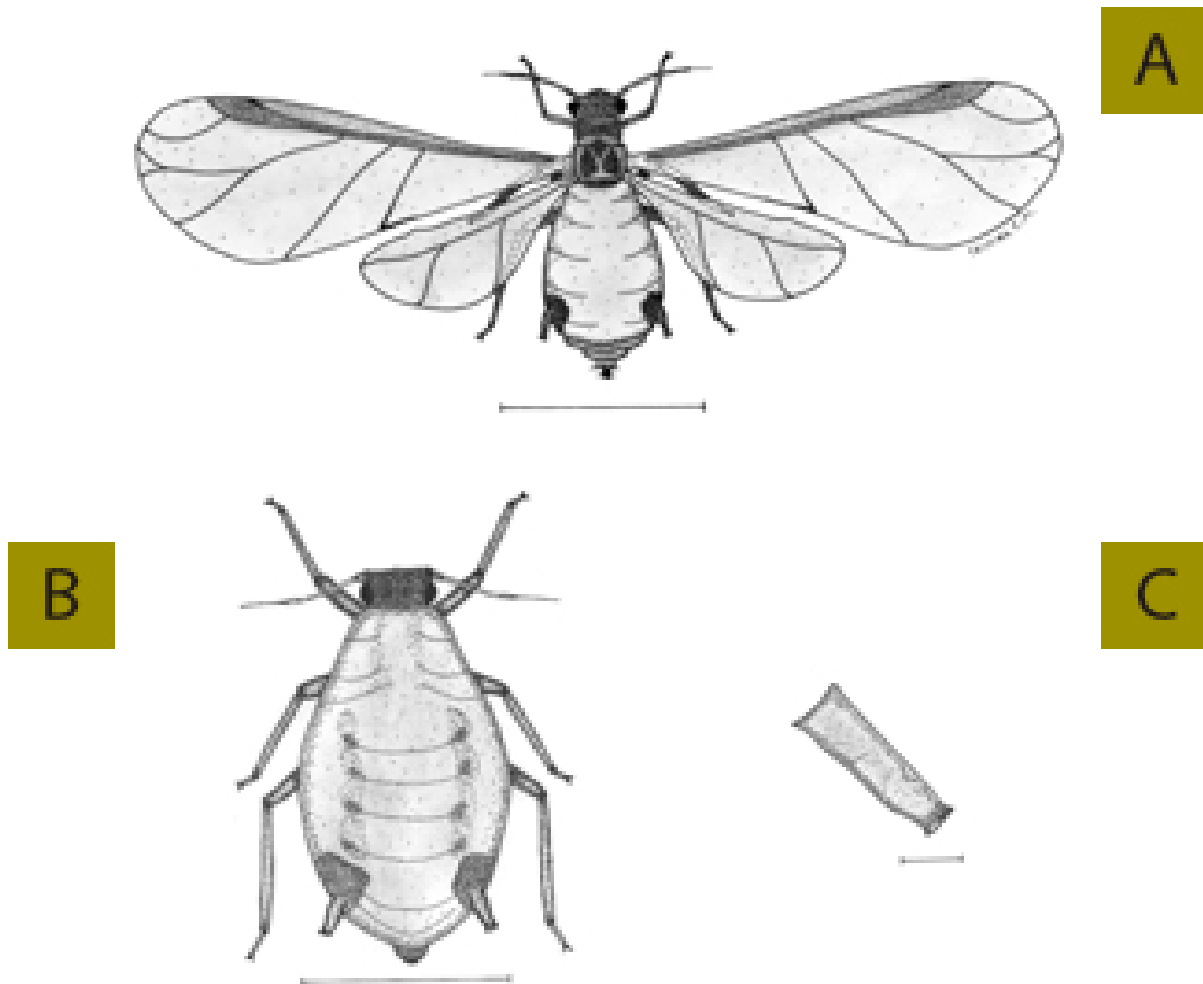


Figura 2. Pulgão-do-milho, *Rhopalosiphum maidis*. Adulto alado em vista dorsal (A); adulto áptero em vista dorsal (B); e sifúnculo em vista lateral (C). Linhas: 1,0 mm (A-B) e 0,1 mm (C).

Referências

ALMEIDA, A. C. L.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O. Detecção de vírus por RT-PCR, hibridização “Dot-blot” e “Dot-ELISA” em milho com mosaico comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 168-174, 2000.

ARCHER, T. L.; CATE, R. H.; EIKENBARY, R. D.; STARKS, K. H. Parasitoids collected from greenbugs and corn leaf aphids in Oklahoma. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 67, p. 11-14, 1974.

BERTELS, A. **Revisão de afídeos no Rio Grande do Sul**. Pelotas: IPEAS, 1973. 64 p. (IPEAS. Boletim Técnico, 84).

BERTI FILHO, E. Hyperparasitism in *Rhopalosiphum maidis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 167-169, 1982.

BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. F. *Rhopalosiphum maidis* (Fitch). In: BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. F. **Aphids on the world's crops**: an identification and information guide. Chichester: John Wiley and Sons, 1984. p. 340-341.

BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. F. Taxonomic issues. In: VAN EMDEN, H. F.; HARRINGTON, R. (Ed.). **Aphids as crop pests**. Wallingford: CABI, 2007. p. 1-29.

BRADFUTE, O. E.; NAULT, L. R.; GORDON, D. T.; ROBERTSON, D. C.; TOLER, R. W.; BOOTHROYD, C. W. Identification of maize rayado fino virus in the United States. **Plant Disease**, v. 64, p. 50-53, 1980.

CARTIER, J. J. On the biology of corn leaf aphid. **Journal of Economic Entomology**, v. 50, n. 1, p. 110-112, 1957.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W. Ocorrência do mosaico em milho no Estado de São Paulo, causado pelo vírus do mosaico do pepino. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 5, p. 159-160, 1972.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma no milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, n. 4, p. 39-41, 1971.

DENG, C. L.; WANG, W. J.; WANG, Z. Y.; JIANG, X.; CAO, Y.; ZHOU, T.; WANG, F. R.; LI, H. F.; FAN, Z. F. The genomic sequence and biological properties of *Pennisetum mosaic virus*, a novel monocot-infecting potyvirus. **Archives of Virology**, v. 153, p. 921-927, 2008.

EL-IBRASHY, M. T.; EL-ZIADY, S.; RIAD, A. A. Laboratory studies on the biology on the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Homoptera: Aphididae). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 15, n. 2, p. 166-174, 1972.

FENG, M. G.; JOHNSON, J. B.; HALBERT, S. E. Parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae and Aphelinidae) and their effect on aphid (Homoptera: Aphididae) populations in irrigated grain in southwestern Idaho. **Environmental Entomology**, v. 21, n. 6, p. 1433-1440, 1992.

FOOTT, W. H. Biology of the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Homoptera: Aphididae), in southwestern Ontario. **Canadian Entomologist**, v. 109, p. 1129-1135, 1977.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.;

- MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.
- GILSTRAP, F. E.; KRING, T. J.; BROOKS, G. W. Parasitism of aphids (Homoptera: Aphididae) associated with Texas sorghum. **Environmental Entomology**, v. 13, n. 6, p. 1613-1617, 1984.
- GONÇALVES, M. C.; MAIA, I. G.; GALLETI, S. R.; FANTIN, G. M. Infecção mista pelo sugarcane mosaic virus e maize rayado fino virus provoca danos na cultura do milho no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 348-352, 2007.
- HENRY, M.; DEDRYVER, C. A. Fluctuations in cereal aphid populations on maize (*Zea mays*) in western France in relation to the epidemiology of barley yellow dwarf virus (BYDV). **Journal of Applied Entomology**, v. 107, n. 4, p. 401-410, 1989.
- HILL, D. S. *Rhopalosiphum maidis* (Fitch). In: HILL, D. S. **Agricultural insect pests of the tropics and their control**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. p. 204.
- KITAJIMA, E. W. Citopatologia e localização de vírus de milho e de leguminosas alimentícias nas plantas infectadas e nos vetores. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 241-254, 1979.
- KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Microscopia eletrônica de organismos do tipo micoplasma nos tecidos do milho afetado pelo enfezamento e nos órgãos da cigarrinha portadora. **Bragantia**, v. 31, p. 76-82, 1972.
- KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. The ultrastructure of the corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic) virus-infected corn leaf tissues and viruliferous vector. **Fitopatologia Brasileira**, v. 7, p. 247-259, 1982.
- KITAJIMA, E. W.; VAN DER PAHLEN, A. Ocorrência do vírus da faixa clorótica das nervuras do milho no Distrito Federal e em Manaus. **Fitopatologia Brasileira**, DF, v. 2, p. 83-84, 1977.
- KITAJIMA, E. W.; YANO, T.; COSTA, A. S. Purification and intracellular localization of isometric viruslike particles associated with Brazilian corn streak virus infection. **Ciência e Cultura**, v. 28, p. 427-430, 1976.
- MAIA, W. J.; LOUZADA, J. N.; CRUZ, I.; ECOLE, C. C.; MAIA, T. J. Efeito da umidade do solo na biologia de *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Homoptera: Aphididae) em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 5, n. 1, p. 37-47, 2006.
- MELO, P. R. **Estudo da variabilidade e do uso de métodos moleculares na detecção dos vírus do rayado fino e do mosaico-comum-do-milho (*Zea mays* L.)**. 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- MISHRA, S.; SINGH, R. Factors affecting supernumerary egg deposition by the parasitoid *Lysiphlebus delhiensis* (Subba Rao & Sharma) (Hymenoptera: Aphididae) into its host

Rhopalosiphum maidis (Fitch). **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 1993.

NAULT, L. R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica**, v. 35, p. 165-175, 1990.

PIKE, K. S.; STARY, P.; MILLER, T.; ALLISON, D.; BOYDSTON, L.; GRAF, G.; GILLESPIE, R. Small-grain aphid parasitoids (Hymenoptera: Aphelinidae and Aphidiidae) of Washington: distribution, relative abundance, seasonal occurrence, and key to known North American species. **Environmental Entomology**, v. 26, n. 6, p. 1299-1311, 1997.

REMAUDIÈRE, G.; NAUMANN-ETIENNE, K. Découverte au Pakistan de l'hôte primaire de *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hom. Aphididae). **Compte Rendu de l'Académie d'Agriculture Française**, v. 77, p. 61-62, 1991.

SHEIFERS, D. L.; SALOMON, R.; MARIE-JEANNE, V.; ALLIOT, B.; SIGNORET, P.; HABER, S.; LOBODA, A.; ENS, W.; SHE, Y. M.; STANDING, K. G. Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel. **Phytopathology**, v. 90, p. 505-513, 2000.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Wallingford: CAB International, 1994. 516 p.

SILVA, A. G. D'A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores**: insetos, hospedeiros e inimigos naturais. Rio de Janeiro: Ministério de Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Agropecuária, 1968. pt. 2, t. 1, 662 p.

SINGH, B. U.; SEETHARAMA, N. Host plant interactions of the corn planthopper, *Peregrinus maidis* Ashm. (Homoptera: Delphacidae) in maize and sorghum agroecosystems. **Arthropod-Plant Interact**, v. 2, p. 163-196, 2008.

Capítulo 17

Principais vírus do milho ausentes do Brasil

Elizabeth de Oliveira Sabato | Viviane Talamini | Frederico Alberto de Oliveira



Introdução

Alguns vírus que ocorrem caracteristicamente no milho, em diversos países do mundo, e causam prejuízos severos na produção das plantas infectadas, não se encontram relatados nessa cultura no Brasil. Dentre esses vírus, destacam-se, pelo potencial destrutivo: *Maize streak virus* (MSV), *Mal de Rio Cuarto virus* (MRCV), *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV), *Maize stripe virus* (MStpV) e os vírus

que simultaneamente infectam plantas de milho causando a virose necrose letal (SHURTLEFF, 1984; KITAJIMA, 1995; GIMÉNEZ PECCI et al., 2012; SABATO et al., 2013). Este capítulo apresenta um resumo de informações sobre sintomas, vetores e hospedeiros desses vírus.

Maize streak virus – MSV

O *Maize streak virus*, que pertence ao grupo *Geminivirus*, é endêmico na África, sendo transmitido principalmente pela cigarrinha *Cicadulina mbila*, e por outras quatro espécies desse gênero de insetos-vetores (THOTTAPPILLY et al., 1993).

A espécie *C. mbila* se encontra incluída na lista de pragas quarentenárias ausentes (A1), relacionadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) (BRASIL, 2015). Observa-se que, na elaboração da lista de pragas quarentenárias para o Brasil, o Mapa analisa, além do potencial destrutivo da praga, rotas de trânsito e riscos de sua introdução no território nacional. A intensificação atual das rotas de trânsito para o continente africano certamente aumenta o risco de introdução desse inseto-vetor e do MSV no Brasil, onde as condições ecológicas são similares às daquelas das regiões endêmicas da África.

Em plantas de milho infectadas, os sintomas aparecem na base das folhas jovens, primeiro, como pequenas manchas de cor palha, que tomam aspecto de raias, com diferentes comprimentos, no sentido das nervuras secundárias e terciárias. Essas raias estreitas se fundem lateralmente, parecendo listras cloróticas interrompidas, que

se estendem em direção ao ápice da folha, podendo atingir a folha inteira. Esses sintomas podem ser identificados em plântulas ou em plantas adultas (Figura 1). As lesões variam da cor branca a amarela, e algumas estirpes do vírus podem causar pigmentação vermelha. As plântulas de milho são infectadas nos estádios iniciais de desenvolvimento e o dano na produção é severo. Plantas de milho infectadas pelo MSV produzem espigas pequenas e com poucos grãos. O MSV pode infectar muitas espécies vegetais da família Poaceae, como o arroz, a cana de açúcar, o trigo, a cevada, o milheto e outras culturas, e espécies de plantas-daninhas (SHURTLEFF, 1984; THOTTAPPILLY et al., 1993; SHEPERD et al., 2010).



Figura 1. *Maize streak virus* em Moçambique.

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Mal de Rio Cuarto virus – MRCV

Na Argentina, o país onde esse vírus foi relatado pela primeira vez, o MRCV é transmitido principalmente pela cigarrinha *Delphacodes kuscheli* que, aparentemente, se encontra ausente do Brasil. Há outros hospedeiros desse vírus, como o trigo. Ele pode ser transmitido por outras espécies de cigarrinhas, além de *D. kuscheli* (NOMÉ et al., 1981; ORNAGHI et al., 1999; ARNEODO et al., 2002; VELÁZQUEZ et al., 2003). Experimentalmente, foi demonstrado, na Argentina, que as espécies de cigarrinhas *Pyrophagus tigrinus* e *Toya propinqua* são capazes de transmitir o MRCV (PRESELLO et al., 1997; VELÁZQUEZ et al., 2002, 2006). Essas espécies de cigarrinhas já foram detectadas na cultura do milho no Brasil, em baixo nível de incidência, o que pode significar risco para a introdução e disseminação desse vírus. A espécie *P. tigrinus* foi detectada nos estados do Maranhão, do Piauí, de Minas Gerais, de Goiás e do Paraná, e a espécie *T. propinqua* foi encontrada no Maranhão (OLIVEIRA et al., 2013).

O sintoma diagnóstico para o MRCV é a presença de enações nas nervuras das folhas e bainhas da palha de espigas. As plantas afetadas apresentam encurtamento de internódios, proliferação de espigas pequenas, colmo achatado e folhas deformadas, em graus variáveis, para diferentes cultivares e dependendo do estágio de desenvolvimento em que foram infectadas. Este vírus encontra-se classificado como membro do grupo *Fijivirus*, pertencente à família Reoviridae (GIMÉNEZ PECCI et al., 2012).

Maize chlorotic mottle virus – MCMV

O MCMV é transmitido por crisomelídeos, porém, também pode ser transmitido mecanicamente, e transmitido em baixa percentagem por sementes (NAULT et al., 1978; NELSON et al., 2011). O MCMV pertence ao grupo *Machlomovirus*, e infecta várias espécies da família Poaceae. Foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos e está presente na Argentina, no Haváí e em vários países da África (SHURTLEFF, 1984; THOTTAPPILLY et al., 1993; NELSON et al., 2011; GIMÉNEZ PECCI et al., 2012).

Esse vírus causa mosqueado clorótico nas folhas jovens da planta de milho. Pequenas manchas cloróticas podem apresentar aspecto de riscas ao longo das nervuras, e os efeitos prejudiciais no desenvolvimento da planta são variáveis em função da susceptibilidade da cultivar. Porém, quando infecta a planta simultaneamente com alguma espécie de *Potyvirus*, ou com determinadas estirpes do *Wheat Streak Mosaic Virus*, causa a necrose letal, que resulta em seca e morte da planta (SHURTLEFF, 1984; NELSON et al., 2011).

Maize stripe virus – MStpV

Esse vírus, relatado pela primeira vez em 1936, ocorre em vários países da África, na Índia, nas Filipinas e na Austrália. Ocorre também na Venezuela e na Colômbia, onde essa virose é denominada “hoja blanca”, e no Peru, e na Flórida (EUA), com a denominação “doença de Tsai”. Pertence ao grupo *Tenuivirus*, infecta várias espécies de Poaceae, e é transmitido de forma persistente pela cigarrinha *Peregrinus maidis*.

Nas plântulas de milho, os sintomas se iniciam como numerosas manchas cloróticas formando listras cloróticas estreitas, a partir da base em direção ao ápice das folhas jovens, que se fundem, formando amplas faixas cloróticas. Há epinastia da planta, torção de folhas, e severa redução na produção (SHURTLEFF, 1984; BRADFUTE; TSAI, 1990; THOTTAPPILLY et al., 1993).

Necrose letal do milho

A necrose letal do milho foi descrita nos Estados Unidos da América em 1976, e ocorre na Argentina (SHURTLEFF, 1984; GIMÉNEZ PECCI et al., 2012). Recentemente, tem sido encontrada em altos níveis de incidência, causando danos no milho em países da África (WANGAI et al., 2012; DE GROOTE et al., 2015). A doença resulta da infecção do milho por uma espécie de *Potyvirus*, incluindo a espécie presente no Brasil (*Sugarcane mosaic virus* – SCMV), que causa a virose chamada mosaico-comum, e o *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV), ausente do Brasil, ou alguma estirpe do *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), vírus relatado pela ocorrência em trigo, no Estado do Rio Grande do Sul. Resulta também da infecção simultânea da planta de milho pelo MCMV e por estirpes do WSMV. Os potyvírus são transmitidos por pulgões; o MCMV é transmitido por espécies de besouros crisomelídeos, incluindo o gênero *Diabrotica*; o WSMV é transmitido por espécies de ácaros. Esses vírus infectam várias espécies de Poaceae (SHURTLEFF, 1984; SCHEETS, 1998; SOUZA et al., 2008; GONÇALVES et al., 2011; GIMÉNEZ PECCI et al., 2012; MAR, 2012; DE GROOTE et al., 2015). As folhas da planta de milho com necrose letal podem apresentar sintomas de mosqueado; tornam-se cloróticas e secam.

As plantas doentes podem apresentar nanismo, inflorescência masculina deformada, espigas pequenas, com poucos ou com nenhum grão, e secam precocemente (GIMÉNEZ PECCI et al., 2012; WANGAI et al., 2012).

Os potyvírus que causam o mosaico--comum, e que podem participar como agentes etiológicos da necrose letal, ocorrem em diversas regiões no Brasil e causam danos, quando em alta incidência. A resistência aos potyvírus tem sido verificada em vários genótipos de milho, sendo, em geral, controlada por poucos genes (REDINBAUGH et al., 2004; SOUZA et al., 2008).

Outros vírus não relatados em milho no Brasil

Outros vírus relatados pela ocorrência em milho, em diferentes países, não têm sido detectados nessa cultura, no Brasil: *Barley yellow dwarf virus* (MYDV) (grupo *Luteovirus*); *Brome mosaic virus* (BMV) (grupo *Bromovirus*); *Maize yellow stripe virus* (MYSV) (grupo *Tenuivirus*), transmitido por *Cicadulina chinai*; *Cucumber mosaic virus* (CMV) (grupo *Cucumovirus*); *Cynodon chlorotic streak* (CCSV) (grupo *Rhabdovirus*); *High plain virus disease*, doença referida na literatura como *High plain virus* (HPV), *Maize red stripe virus* (MRSV/MRStV), ou *Wheat mosaic virus* (WMoV) (grupo *Emaravirus*), disseminada pelo ácaro *Aceria tosichella* Keifer; *Maize rough dwarf* (MRDV) (grupo *Fijivirus* – *Reoviridae*) (SHURTLEFF, 1984; THOTTAPPILLY et al., 1993; LOUIE; ABT, 2004; ORTIZ et al., 2014).

Referências

- ARNEODO, J. D.; GUZMÁN, L. R.; CONCI, L. R.; LAGUNA, I. G.; TRUOL, G. A. Transmission features of *Mal de Rio Cuarto* virus in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. **Annals of Applied Biology**, v. 141, p. 195-200, 2002.
- BRADFUTE, O. E.; TSAI, J. H. Rapid identification of maize stripe virus, **Phytopathology**, v. 80, n. 8, p. 715-719, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lista de pragas quarentenárias ausentes**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Importacao/Arquivos%20de%20Quarentenas_Pragas/Listas%20de%20Pragas%20Quarenten%C3%A1rias%20Ausentes%20-%20A1.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2015.
- DE GROOTE, H.; TONGRUKSAWATTANA, S.; FRANCIS OLOO, F.; DAS, B. **Distribution and impact of maize lethal necrosis in Kenya**. México: CIMMYT, 2015. Disponível em: <http://www.cimmyt.org/en/component/docman/doc_download/72-distribution-and-impact-of-mln-in-kenya-brief-may-2015>. Acesso em: 16 fev. 2016.
- GIMÉNEZ PECCI, M. P.; LAGUNA, I. G.; LENARDON, S. L. **Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina**. Buenos Aires: INTA, 2012. 208 p.
- GONÇALVES, M. C.; GALDEANO, D. M.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M. Variabilidade genética de *Sugarcane mosaic virus* causando mosaico em milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 346, p. 362-369, 2011.
- KITAJIMA, E. W. **Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986-1993)**. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1995. 92 p.
- LOUIE, R.; ABT, J. J. Mechanical transmission of maize rough dwarf virus. **Maydica**, v. 49, p. 231-240, 2004.
- MAR, T. B. **Ocorrência e caracterização do *Wheat streak mosaic virus* no Brasil**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.
- NAULT, L. R.; STYER, W. E.; COFEY, M. E.; GORDON, D. T.; NEGI, L. S.; NIBLET, C. L. Transmission of maize chlorotic mottle virus by Chrysomelidae Beetles. **Phytopathology**, v. 68, p. 1071-1074, 1978.
- NELSON, S.; BREWBAKER, J.; HU, J. Maize chlorotic mottle. **Plant Disease**, p. 1-6, Dec. 2011. Disponível em: <<http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-79.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2016.
- NOMÉ, S. F.; LENARDON, S. L.; RAJU, B. C.; LAGUNA, I. G.; LOWE, S. K.; DOCAMPO, D. Association of reovirus-like particles with “Enfermedad de Rio IV” of maize in Argentina.

Phytopathologische Zeitschrift, v. 101, p. 7-15, 1981.

OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E.; SOUZA, I. R. P.; ALVES, E.; DOLEZAL, W.; PARADELL, S.; REMES LENICOV, A. M. M.; FRIZZAS, M. R. Abundance and species richness of leafhoppers and planthoppers (Hemiptera: Cicadellidae and Delphacidae) in Brazilian maize crops. **The Florida Entomologist**, v. 96, p. 1470-1481, 2013.

ORNAGHI, J. A.; MARCH, G. J.; BOITO, G. T.; MARINELLI, A.; BEVIACQUA, J. E.; GIUGLIA, J.; LENARDON, S. L. Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli* vector of "Mal de Rio Cuarto" virus. **Maydica**, v. 44, n. 3, p. 219-223, 1999.

ORTIZ, V.; BETESE LUCAS, J.; LOPEZ QUEROL, A.; ROMERO, J. Detection of Maize rough dwarf virus in Spain: a survey of susceptible host genotypes and molecular characterization of two genomic segments of the virus. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 1, p. 40-53, 2014.

PRESELLO, D. A.; COSTAMAGNA, A.; CONCI, L. R.; REMES LENICOV, A. M. M. de; GUZMÁN, F. A.; HERRERA, P. S. Mal de Río Cuarto del maíz: estudio de la capacidad vectora de las poblaciones de *Toya propinqua* presentes en el area de Pergamino. In: CONGRESO NACIONAL DE MAÍZ, 6., 1997, Pergamino. **Anais...** Pergamino: [s.n.], 1997. Tomo II, p. 73-78.

REDINBAUGH, M. G.; JONES, M. W.; GINGERY, R. E. The genetics of virus resistance in maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, v. 49, p. 183-190, 2004.

SABATO, E. O.; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T. **Identificação e controle de doenças do milho**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2013. 145 p.

SCHEETS, K. Maize chlorotic mottle machlomovirus and wheat streak mosaic rymovirus Increase in the sinergistic disease corn lethal necrosis. **Virology**, v. 242, p. 28-38, 1998.

SHEPERD, D. N.; MARTIN, D. P.; VAN DER WALT, E.; DENT, K.; VARSANI, A.; RYBICKI, E. P. Maize streak virus: an old and complex "emerging" pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078771>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn diseases**. 2nd ed. St. Paul: APS, 1984. 105 p.

SOUZA, I. R. P.; SCHUELTER, R.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; OLIVEIRA, E.; REDINBAUGH, M. Mapping QTL contributing to SCMV resistance in tropical maize. **Hereditas**, v. 145, p. 167-173, 2008.

THOTTAPPILLY, G.; BOSQUE-PEREZ N. A.; ROSSEL, H. W. Viruses and virus diseases of maize Tropical Africa. **Plant Pathology**, v. 42, p. 494-509, 1993.

VELÁZQUEZ, P. D.; ARNEODO, J. D.; GUZMÁN, L. R.; CONCI, L. R.; TRUOL, G. A. *Delphacodes haywardi* Mui, a new natural vector do Mal de Rio Cuarto virus in Argentina. **Journal of Phytopathology**, v. 151, p. 1-4, 2003.

VELÁZQUEZ, P. D.; GUZMÁN, F. A.; CONCI, L. R.; REMES LENICOV, A. M. M.; TRUOL, G. A. *Pyrophagus tigrinus* Remes Lenicov & Varela (Hemiptera: Delphacidae) nuevo vector del Mal de Río Cuarto virus (MRCV) en condiciones experimentales. **Agriscientia**, v. 23, n. 1, p. 9-14, 2006.

VELÁZQUEZ, P. D.; GUZMÁN, F. A.; CONCI, L. R.; TRUOL, G. A. *Delphacodes tigrinus* REMES LENICOV, VARELA (Hemiptera: Delphacidae) nuevo vector del Mal de Río Cuarto virus (MRCV) en condiciones experimentales. In: JORNADAS FITOSANITARIAS ARGENTINAS, 11., 2002. Río Cuarto. **Libro de resúmenes**. Río Cuarto: [s.n.], 2002. p. 55.

WANGAI, A. W.; REDINBAUGH, M. G.; KINYUA, Z. M.; MIANO, D. W.; LELEY, P. K.; KASINA, M.; MAHUKU, G.; SCHEETS, K. First report of Maize chlorotic mottle virus and Maize Lethal Necrosis in Kenya. **Plant Disease**, v. 96, n. 10, p. 1582, 2012.

Literatura recomendada

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O.; GIMÉNEZ PECCI, M. L. P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Ocorrência e perdas causadas por mollicutes e vírus na cultura do milho safrinha no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 19-25, jan. 2003.

STEWART, L. R.; PAUL, P. A.; QU, F.; REDINBAUGH, M. G.; MIAO, H.; TODD, J.; JONES, M. Wheat mosaic virus (WMoV), the causal agent of high plains disease, is present in Ohio wheat fields. **Plant Disease**, v. 97, n. 8, p. 1125, 2013. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-03-13-0243-PDN>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

Capítulo 18

Sintomas na planta de milho e danos na produção - Identificação de possíveis causas

Antônio Marcos Coelho | João Herbert Moreira Viana | Elizabeth de Oliveira Sabato



Introdução

O desenvolvimento das plantas está relacionado a um conjunto de fatores abióticos que envolvem o meio físico onde vivem. Assim, as plantas crescem envolvidas em uma atmosfera que deve conter uma composição adequada, apoiam-se em um meio poroso sólido, o solo, que, além do suporte mecânico, serve como meio de

suprimento de água, de oxigênio e de nutrientes, e estão expostas à radiação solar, que é sua fonte primária de energia.

Cada um desses componentes do ambiente tem associados parâmetros constitutivos que variam no tempo e no espaço, mas que apresentam valores limites acima ou abaixo dos quais ocorre restrição à plena expressão do potencial genético da planta e, em casos extremos, podem comprometer seu desenvolvimento, ou mesmo levá-la à morte, gerando sintomas observáveis.

Alguns fatores são relativamente estáveis, como a composição elementar básica da atmosfera, enquanto outros são altamente variáveis, como o teor de água e nutrientes. Alguns podem ser artificialmente manipulados, como a água via irrigação e a fertilidade do solo, outros são dependentes das condições locais, como a radiação incidente. Outro aspecto importante é a interação entre esses fatores, que não agem isoladamente, e podem formar combinações mais ou menos favoráveis ao pleno desenvolvimento da planta. Assim, deficiências nutricionais ou problemas relacionados à sanidade podem surgir ou serem induzidos como efeitos colaterais de problemas de natureza do meio físico e da ação de agentes patogênicos.

Neste capítulo, são apresentados a caracterização de sintomas na planta de milho e seus efeitos no desenvolvimento e produtividade, causados por deficiências nutricionais, por ação de agentes físicos ou de agentes químicos, e de doenças sistêmicas, que causam sintomas fisiológicos, associados a informações que auxiliam na realização de diagnósticos.

Sintomas de deficiência nutricional

Os sintomas de deficiência nutricional podem constituir, em condições de campo, em elemento auxiliar na identificação da carência nutricional. Entretanto, é importante salientar que, como regra geral, distúrbios nutricionais que inibem levemente o desenvolvimento e a produtividade das plantas não se caracterizam por sintomas específicos e visíveis. Os sintomas são claramente visíveis quando a deficiência é acentuada, e o desenvolvimento e a produtividade são distintamente reduzidos. Entretanto, existem algumas exceções. Por exemplo, sintomas de deficiência de magnésio em milho, que podem, em algumas situações, ser esporadicamente observados em condições de campo, durante o desenvolvimento da planta, não têm efeito na redução da produtividade. Outro exemplo observado nas condições de campo, para alguns híbridos de milho, principalmente sob condições de nebulosidade prolongada, é a presença de clorose (amarelecimento) entre as nervuras das folhas novas, sem caracterizar deficiência nutricional (COELHO, 2008).

Assim, para a identificação da deficiência com base na sintomatologia, é necessário que o técnico tenha razoável experiência de campo, uma vez que deficiências nutricionais, sintomas de doenças, pragas e distúrbios fisiológicos podem ser confundidos. Por exemplo, sintomas causados por doenças, pragas ou danos por herbicidas podem assemelhar-se a certas deficiências nutricionais de macro e micronutrientes. Por outro lado, os sintomas de deficiências nutricionais na planta de milho no campo podem ser causados por mais de um fator. Em plantas de milho, os açúcares combinam-se com as flavonas para formar as antocianinas (pigmentos de cor roxa, vermelha e amarela) e sua acumulação

pode ser causada por suprimento de fósforo insuficiente, baixas temperaturas, danos às raízes causados por insetos, deficiência de nitrogênio, ou doenças sistêmicas, causadas por mollicutes e vírus.

Assim, para se fazer um diagnóstico visual mais preciso, é necessário associar informações adicionais, incluindo resultados de análises de solo para pH, matéria orgânica e nutrientes minerais (macro e micro), estado da água do solo (seco/alagado), as condições meteorológicas (baixa temperatura ou geada) e a aplicação de fertilizantes, fungicidas, pesticidas ou herbicidas, ou testes específicos para detecção de agentes causais de doenças.

A diagnose visual de deficiência nutricional baseada em sintomas requer uma organização sistemática como elaborada por Coelho e França (1995) e Marschner (1997). Sintomas de deficiência podem aparecer em folhas velhas ou folhas novas, dependendo de o nutriente em questão ser realmente translocado na planta (maior ou menor mobilidade). Os sintomas de clorose ou de necrose e o padrão de ambos são critérios importantes para esse diagnóstico.

Sintomas iniciais na parte inferior da planta

Com clorose e/ou necrose

Nitrogênio

Caracterização do sintoma: amarelecimento da ponta para a base em forma de “V”; secamento começando na ponta das folhas mais velhas e progredindo ao longo da nervura principal; necrose e dilaceramento, colmos finos, redução no tamanho da espiga e na produção de grãos (Figura 1). A tendência de as folhas jovens

superiores permanecerem verdes, e as folhas inferiores, amarelas ou secas, é uma indicação da mobilidade de N na planta. Quando as raízes são incapazes de absorver N suficiente para satisfazer a necessidade de crescimento das plantas, a proteína nas folhas mais velhas é convertida em N solúvel, translocada para os tecidos meristemáticos ativos e reutilizada na síntese de novas proteínas.



Figura 1. Deficiência de nitrogênio.

Fotos: Antônio Marcos Coelho

Condições de manifestação: já que, nas condições brasileiras, as respostas do milho à adubação nitrogenada são generalizadas, é indicativo de que os solos têm apresentado, de um modo geral, capacidade de suprimento de N-mineral “disponível” insuficiente para o alcance de altas produtividades. Nessas condições, sem aporte de N, a deficiência se manifestará na fase inicial de desenvolvimento da planta; condições climáticas associadas aos tipos de solos são determinantes. Em solos arenosos e em solos de textura média ou argilosos, em plantio direto, cultivados anteriormente com gramíneas (trigo, aveia, braquiária, com alta relação C/N), nos solos ácidos e com o uso de compostos orgânicos com alta relação C/N, o milho pode apresentar deficiência, se não houver aplicação de doses adequadas de N, na semeadura, e em cobertura.

Potássio

Caracterização do sintoma: clorose nas pontas e nas margens das folhas mais velhas, seguida por secamento, necrose (“queima”) e dilaceração do tecido; colmos com internódios mais curtos; as folhas mais novas podem mostrar clorose internerval típica da falta de ferro. Outro sintoma típico da ocorrência de deficiência de K em milho é o acamamento de plantas, em razão do quebramento do colmo (Figura 2). Quando o suprimento de água no solo é limitado, os sintomas da perda de turgescência e a murcha das folhas são acentuados em plantas desenvolvendo-se em solos deficientes em K e que não receberam um suprimento adequado desse nutriente.



Figura 2. Deficiência de potássio.

Fotos: Antônio Marcos Coelho

Condições de manifestação: de um modo geral, a deficiência de K em milho tem sido observada em solos pobres neste nutriente, com teores de K “disponível” inferiores a 50 mg/dm^3 (extrator Mehlich1). No sistema de semeadura do milho em sucessão à soja como segunda cultura ou safrinha, e na produção de forragem, tem sido observado um desbalanceamento dos teores de K no solo, em razão da maior extração pela soja, e pelo milho destinado à produção de forragem. Nestas condições, o milho pode apresentar deficiência deste nutriente, com alto índice de acamamento. Por outro lado, o uso das relações entre K/Ca/Mg não tem sido adequado para explicar uma possível causa para o aparecimento de

deficiências desses nutrientes em milho. O que parece ser mais importante é o teor absoluto desses nutrientes no solo, cujos valores devem estar acima do nível crítico.

Magnésio

Caracterização do sintoma: amarelecimento das margens das folhas mais velhas e posterior aparecimento de estrias internervais, podendo vir a seguir necrose das regiões cloróticas; o sintoma progride para as folhas mais novas (Figura 3).



Figura 3. Deficiência de magnésio.

Fotos: Antônio Marcos Coelho

Condições de manifestação: solos ácidos ou solos que se desenvolveram sobre um material calcítico, ou que receberam calagem utilizando um calcário calcítico, com baixos teores de Mg ($\leq 0,5 \text{ cmol}_c/\text{dm}^3$ de solo). Entretanto, os sintomas visíveis, transitórios, de deficiência de magnésio em milho, que por vezes podem ser observados em condições de campo, durante o desenvolvimento vegetativo, podem não ter efeito prejudicial para o rendimento final de grãos, como observado em experimentos conduzidos por Vilela et al. (1987). Nesses experimentos, apesar de o milho apresentar sintomas característicos de deficiência de magnésio, não foram observados aumentos significativos na produtividade de grãos por causa do efeito imediato e residual das doses de Mg aplicadas (VILELA et al., 1987).

Zinco

Caracterização do sintoma: faixas brancas ou amareladas entre a nervura principal e as bordas, podendo seguir-se necrose e ocorrência de tons roxos; folhas novas que se desenrolam na região de crescimento com coloração esbranquiçada ou amarelo-pálido, internódios curtos (Figura 4).



Figura 4. Deficiência de zinco.

Fotos: Antônio Marcos Coelho

Condições de manifestação: a deficiência de zinco é generalizada entre as plantas cultivadas em solos ácidos, altamente intemperizados e em solos calcários. Neste último caso, a deficiência de zinco é frequentemente associada com a deficiência de ferro. Assim, nas condições dos solos brasileiros, de todos os micronutrientes, o zinco é o que apresenta as maiores respostas de produção na cultura do milho, em razão da deficiência generalizada que ocorre principalmente em solos sob vegetação de cerrado. Nestas condições, deficiência de Zn em milho e, conseqüentemente, respostas acentuadas à adubação têm sido observadas em solo cujos teores de zinco encontram-se abaixo de 1,0 mg/dm³ de solo (extrator Mehlich1) ou 0,5 mg/dm³ de solo (extrator DTPA).

Fósforo

Caracterização do sintoma: em condições de deficiência severa verifica-se cor verde-escura das folhas mais velhas, seguindo-se tons roxos nas pontas e margens; o colmo também pode ficar roxo (Figura 5).



Figura 5. Deficiência de fósforo.

Foto: Emerson Borghi

Em condições menos severas de deficiência, ocorre um desenvolvimento inicial mais lento, sem apresentar a coloração típica visível da deficiência de fósforo (Figura 6), demonstrando, entretanto, acentuada redução na produtividade do milho (Tabela 1).



Figura 6. Aspecto geral do desenvolvimento das plantas de milho em função do efeito residual e reposição anual de doses de fósforo.

Foto: Antônio Marcos Coelho

Tabela 1. Efeito dos teores de fósforo (P) no solo e doses de adubação fosfatada no desenvolvimento e na produtividade de milho.

P-solo ⁽¹⁾ (mg/dm ³)	Dose de P ₂ O ₅ (kg/ha)	APV ⁴ (²)(cm)	APF ⁽³⁾ (cm)	Produção de grãos (t/ha)
5,54	0	20	165	3,82
6,71	100	45	245	9,47
13,48	0	35	240	10,07
13,64	100	45	260	11,37

⁽¹⁾Extrator Mehlich-1. ⁽²⁾Altura de plantas no estágio V4-folha. ⁽³⁾Altura de plantas no florescimento.

Condições de manifestação: de modo geral, os solos tropicais, nas condições naturais, são extremamente pobres em fósforo “disponível”, embora possam apresentar teores totais de P relativamente altos, da ordem de 1.000 mg/dm³ de solo (0,10%) (COELHO, 2014). Assim, deficiência generalizada deste nutriente irá se manifestar se adubações fosfatadas adequadas não forem utilizadas. De posse destas informações, os agricultores têm utilizado, nas adubações, formulações com altas concentrações de P; conforme dados do Anuário Estatístico do Setor de Fertilizantes (2013), que indicam que o consumo médio de P para a cultura do milho no Brasil situa-se ao redor de 50 kg de P/ha, ou seja, 120 kg de P₂O₅/ha em equivalente fertilizante. Em solos com altas relações C:N, ou que receberam adubos orgânicos com alta relação C:N, a deficiência de N pode induzir, na fase inicial do milho, sintomas típicos da deficiência de P.

Molibdênio

Caracterização do sintoma: em condições de campo, a deficiência de Mo em milho é muito rara, mas quando ocorre, causa pequenas manchas brancas nas nervuras maiores, encurvamento do limbo ao longo da nervura principal e a lâmina da folha não apresenta expansão.

Condições de manifestação: deficiência de molibdênio tem maior probabilidade de ocorrer em solos ácidos (pH < 5,5). A correção do pH dos solos ácidos, através da calagem, aumenta a disponibilidade de molibdênio, se os níveis desse micronutriente, no solo, forem adequados. Solos arenosos apresentam com mais frequência deficiência de molibdênio do que os solos de textura média ou argilosos. Doses pesadas de fertilizantes fosfatados aumentam a absorção de molibdênio pelas plantas, ao passo que doses

elevadas de fertilizantes, contendo sulfato, podem induzir deficiência de molibdênio.

Sintomas iniciais na parte superior da planta

Com clorose e/ou necrose

Cálcio

Caracterização do sintoma: “gelatinização” das pontas das folhas mais novas, que, quando secas, grudam umas às outras e à medida que a planta cresce as pontas podem ficar presas. Nas folhas superiores aparecem, sucessivamente, amarelecimento, secamento, necrose e dilaceração das margens e clorose internerval (faixas largas); morte da região de crescimento.

Condições de manifestação: solos ácidos e solos arenosos com baixos teores de Ca. Entretanto, com a prática generalizada de calagem, utilizando materiais contendo Ca, nas condições de campo, não tem sido observada deficiência deste nutriente em milho. Mesmo em solos ácidos com baixos teores de Ca, o efeito tóxico causado pelo alumínio é o primeiro sintoma a ser identificado, e assim mascara o efeito da deficiência de cálcio.

Boro

Caracterização do sintoma: nas folhas novas, observam-se faixas alongadas, aquosas ou transparentes que, depois, ficam brancas ou secas; o ponto de crescimento morre; baixa polinização; quando as espigas se desenvolvem podem mostrar faixas marrons de cortiça na base dos grãos (Figura 7). A deficiência de boro é mais importante para o desenvolvimento reprodutivo que para o

crescimento vegetativo (DELL; HUNG, 1997; COELHO; COELHO FILHO, 2006). Em condições de deficiência severa de boro, ocorre má formação de espigas e também redução na produtividade do milho (MOZAFAR, 1987; COELHO; COELHO FILHO, 2006).

<



Figura 7. Deficiência de boro.

Fotos: Antônio Marcos Coelho

Condições de manifestação: solos arenosos e com baixos teores de matéria orgânica. A disponibilidade de B nos solos decresce com o

aumento do pH, principalmente em solos calcários e com altos teores de argila, presumivelmente como resultado da formação do ânion $B(OH)_4^-$ e sua adsorção no solo. Por causa da sua mobilidade nos solos, em condições de altas precipitações, o B pode ser lixiviado para as camadas mais profundas do solo.

Cobre

Caracterização do sintoma: amarelecimento das folhas novas logo que começam a se desenrolar, depois as pontas se curvam e mostram necroses; as folhas tornam-se amarelas e mostram faixas semelhantes às provocadas pela carência de ferro; as margens ficam necrosadas; o colmo torna-se macio e se dobra (Figura 8).



Figura 8. Deficiência de cobre.

Fotos: Antônio Marcos Coelho

Condições de manifestação: deficiência de cobre é frequentemente verificada em plantas desenvolvendo-se em solos com baixos teores de Cu total; solos com presença excessiva de íons metálicos, como ferro, manganês e alumínio reduzem a disponibilidade de cobre para as plantas; solos de textura arenosa, solos calcários e solos com altos teores de matéria orgânica, onde o Cu pode ser complexado em substâncias orgânicas. Aplicações de altas doses de N podem também acentuar a deficiência desse micronutriente.

Ferro

Caracterização do sintoma: clorose internerval em toda a extensão da lâmina foliar, permanecendo verdes apenas as nervuras, reticulado fino de nervuras.

Condições de manifestação: deficiência de Fe em milho geralmente ocorre em solos calcários e solos arenosos com baixos teores deste nutriente; desequilíbrio em relação a outros metais, tais como molibdênio, cobre e manganês. Esse nutriente é o principal responsável pelo aparecimento de clorose nas folhas, pelo uso excessivo de calcário.

Manganês

Caracterização do sintoma: clorose internerval das folhas mais novas (reticulado grosso de nervuras) e, depois, de todas as folhas, quando a deficiência é moderada; em casos mais severos, aparecem no tecido faixas longas e brancas, e o tecido do meio da área clorótica pode morrer e desprender-se; colmos finos (Figura 9).



Figura 9. Deficiência de manganês.

Fotos: Antônio Marcos Coelho

Condições de manifestação: deficiência de manganês é bastante comum em plantas de milho desenvolvendo-se em solos formados de material de origem com baixos teores de Mn, e em solos tropicais altamente lixiviados. Deficiência é também comum em solos com altos valores de pH, contendo carbonato livre, particularmente quando combinado com altos teores de matéria orgânica. A probabilidade de respostas do milho ao Mn pode ser melhor identificada pelos teores de Mn no solo associados aos valores de pH.

Sem clorose e/ou necrose

Enxofre

Caracterização do sintoma: folhas novas e recém-formadas com coloração amarelo-pálido ou verde-suave. Ao contrário da deficiência de nitrogênio, os sintomas ocorrem nas folhas novas, indicando que os tecidos mais velhos não podem contribuir para o suprimento de enxofre para os tecidos novos, os quais são dependentes do nutriente absorvido pelas raízes.

Condições de manifestação: deficiência de enxofre em milho pode ocorrer em solos ácidos e arenosos, pobres em matéria orgânica e em regiões caracterizadas por precipitações intensas. No passado, o uso generalizado de fertilizantes menos concentrados e contendo enxofre praticamente eliminava o aparecimento da deficiência desse nutriente. Atualmente o uso de formulações concentradas, sem enxofre, pode levar à deficiência generalizada desse nutriente. Por outro lado, o uso do gesso agrícola (24% de S), como condicionador de subsolo de solos ácidos e pobres em cálcio, é uma excelente fonte de enxofre para as plantas.

Sintomas por causas diversas

Fatores climáticos

Temperatura

Caracterização do sintoma: plântulas com folhas arroxeadas. Espigas com falhas na formação de grãos.

Condições de manifestação: a temperatura pode afetar o desenvolvimento da planta, seja limitando ou impedindo seu desenvolvimento, ou causando estresse térmico, quando as temperaturas estão abaixo de 5 °C ou acima de 32 °C. A faixa ótima de temperatura diurna é de 22 °C a 32 °C, e a noturna, 17 °C a 23 °C. A temperatura elevada pode afetar a produtividade, especialmente a temperatura noturna alta, e o estresse térmico pode vir associado ao estresse hídrico, com perdas de produtividade que podem chegar a 5% por dia de estresse. A temperatura elevada pode prejudicar a polinização e resultar em espigas falhadas.

Geadas podem afetar a planta nova, mas sem limitar a produção, se o ponto de crescimento não for afetado. As plântulas podem apresentar uma coloração vermelho-arroxeadada, sob estresse de frio (Figura 10), que pode ser revertida se as condições de temperatura mudarem (SHAW; NEWTON, 1991; NAVEED et al., 2014). O frio associado à umidade também pode favorecer o ataque de doenças radiculares.



Figura 10. Folhas arroxeadas; efeito da temperatura ambiente.

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Umidade do solo

Caracterização do sintoma: a) estresse hídrico: se leve ou inicial, resulta em murcha ou perda de turgor, e estresse prolongado provoca seca das folhas baixas (Figura 11); espigas com encurtamento da palha e aparecimento da ponta do sabugo (“chupeta”); falhas na produção de grãos (Figura 12); morte da planta; b) excesso de água no solo: amarelecimento generalizado das folhas (ALVES et al., 2002).





Figura 11. Aspectos da cultura do milho sob condições de deficiência hídrica.

Fotos: Ramon Costa Alvarenga



Figura 12. Efeito do estresse hídrico no pré--florescimento.

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Condições de manifestação: o fator climático isoladamente mais importante é a precipitação atmosférica, que controla a disponibilidade de água para as culturas, e geralmente é o fator mais limitante para a produtividade em áreas de sequeiro. A disponibilidade da água vai depender da umidade presente no solo, proveniente da chuva, ou de irrigação, das características do solo (armazenamento e suprimento da água), da capacidade da planta de absorver e usar a água e da demanda atmosférica, função da energia disponível.

Os efeitos diretos de períodos prolongados de estiagem na produtividade da lavoura de milho são mais críticos nos períodos de

florescimento e polinização (Figura 13), porém, salienta-se aqui que esses efeitos podem ser amplificados ou amenizados pelos demais fatores bióticos e abióticos, e podem ser usados como indicativos de outros problemas. O estresse hídrico pode levar à deficiência nutricional, como no caso da redução da umidade na região de colocação dos fertilizantes. Da mesma forma, períodos de chuvas intensas e prolongadas podem causar os sintomas relacionados ao encharcamento do solo (amarelecimento), que podem ser agravados pela baixa insolação por causa da cobertura das nuvens.



Figura 13. Efeito do estresse hídrico intermitente ocorrido nos períodos de florescimento, polinização e formação dos grãos na espiga.

Foto: Antônio Marcos Coelho

Solos muito arenosos (especialmente de areia grossa ou cascalho) podem ter uma porosidade muito alta, dominada por macroporos, o que pode ocasionar déficit hídrico muito frequente, caso o suprimento de água não seja adequado, e causar sintomas de murcha e perda de turgor. Esses solos geralmente apresentam baixa capacidade de retenção de água e rápida drenagem interna, o que resulta em maior possibilidade de eventos de estresse hídrico.

A drenagem excessiva também aumenta o risco da perda de nutrientes solúveis por percolação profunda, que pode resultar em deficiência nutricional nas plantas por lixiviação dos fertilizantes. Também pode apresentar baixa coesão, com redução da capacidade de suporte e maior propensão ao tombamento das plantas pelo vento.

Vento

Caracterização do sintoma: tombamento das plantas pela raiz ou em razão do quebramento de colmos.

Condições de manifestação: o vento pode causar o tombamento das plantas, resultando em perda ou impossibilidade de colheita mecânica e comprometimento da qualidade do produto. O tombamento pode ocorrer por quebra do colmo ou desenraizamento da planta (Figuras 14 e 15), neste último caso podendo estar associado ao baixo ancoramento da planta. A suscetibilidade ao acamamento ou tombamento é uma das características avaliadas no desenvolvimento de cultivares de milho, e alguns materiais podem ser mais suscetíveis que outros, podendo chegar a 25% de perdas no campo. A queda de granizo pode também contribuir para

o acamamento, além de ter efeitos catastróficos sobre a cultura, com o dano às folhas e colmos e redução do estande. A avaliação no campo deve buscar todos os elementos que podem ter contribuído para o evento, como doenças e pragas do colmo e/ou pragas de solo (NIELSEN, 1988; GOMES et al., 2010).



Figura 14. Tombamento do milho pela raiz por causa do efeito de ventos.

Foto: Antônio Marcos Coelho



Figura 15. Tombamento de milho decorrente do enfraquecimento das plantas por enfezamento e ação de fungos da podridão do colmo.

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Fatores ligados ao manejo

Compactação de solo

Caracterização do sintoma: plântulas com redução geral do desenvolvimento, raízes com desvio do crescimento da radícula e raízes seminais laterais, sintomas relacionados à deficiência de aeração.

Condições de manifestação: porosidade reduzida e/ou dominada por microporos. Alguns solos podem apresentar porosidade naturalmente reduzida ou dominada por microporos. Geralmente, no

entanto, a redução de porosidade em solos agrícolas está associada a processos de compactação ou adensamento. Esses processos podem estar associados ao manejo, como o uso de equipamentos agrícolas ou ao pisoteio animal, que exercem pressão sobre o solo, que se deforma de forma irreversível após determinada carga mínima.

A redução do espaço poroso traz diversos impactos às plantas, que podem redundar em restrições ao desenvolvimento do sistema radicular e, em última instância, causar danos e injúrias, com sintomas visíveis. O primeiro tipo de impacto está relacionado ao aumento da resistência mecânica do solo, em função da redução dos macroporos e do maior ajuste das partículas, o que leva a maior dificuldade do crescimento do sistema radicular. De acordo com Foloni et al. (2003), uma camada compactada, com resistência à penetração de 1,4 Mpa, impede que o sistema radicular do milho atravesse e se desenvolva em profundidade. Em um Latossolo Vermelho, textura média (32% de argila), Freddi et al. (2007) obtiveram um valor de resistência à penetração crítico de 1,6 Mpa, a partir do qual a produtividade de grãos do milho decresceu de 6,72 t/ha para 4,14 t/ha, com redução na produtividade de 38%.

O sistema radicular menos desenvolvido, por sua vez, está mais sujeito tanto ao déficit hídrico como ao nutricional, por explorar um menor volume de solo. Desta forma, sintomas de deficiência hídrica, como murchamento, ou nutricional, como os descritos nos tópicos anteriores, podem ser induzidos pela restrição e pelo confinamento do sistema radicular a uma camada restrita de solo. Neste caso, diagnóstico correto do problema exige a análise do perfil do solo, em vários pontos do terreno, para sua identificação segura.

O segundo impacto está relacionado à redução da permeabilidade e da difusão de gases, especialmente do oxigênio, que pode ocasionar sintomas de anoxia nas plantas. Esta condição será mais provável em solos compactados ou com camada adensada relativamente rasa que, em períodos de precipitação pluviométrica elevada, podem levar à saturação da camada superficial do solo. Os sintomas de amarelecimento das plantas decorrentes deste fato devem ser associados a essas condições para diagnóstico. Este mesmo solo pode também ter sua água disponível reduzida pelo menor volume de poros que armazenam água na faixa de tensão disponível.

Um solo dominado por microporos pode apresentar um volume de água sob tensão mais elevado do que a planta pode absorver, provocando os efeitos descritos de déficit hídrico, mesmo que tenha água total em valores significativos. A restrição à infiltração do solo em função da compactação também pode ocasionar, de forma indireta, a redução da água disponível, na medida em que ocorre a perda de água precipitada por escoamento superficial. Esse escoamento superficial pode então levar à erosão localizada e ao tombamento das plantas.

Danos por herbicidas

Caracterização do sintoma: danos e injúrias causadas por herbicidas podem apresentar diversos tipos de sintomas, a depender dos princípios ativos e das condições da injúria, como necrose, amarelecimento de pontas de folhas, clorose internerval, redução do desenvolvimento, morte de plântulas.

Condições de manifestação: estão associadas a problemas durante a aplicação, como equipamentos em condições inadequadas, sobreposição de passadas ou deriva de produto. Sintomas como o amarelecimento de pontas de folhas ou clorose internerval podem ser similares aos de outros tipos de danos (Figura 16), e sua identificação no campo deve ser associada ao conhecimento das condições gerais de condução da cultura, e ao acompanhamento dos procedimentos dos tratos culturais. Geralmente ocorrem em porções limitadas dos talhões e podem ser reversíveis dependendo da extensão do dano (DEWEY LEE, 2012).





Figura 16. Sintomas em milho causados por deriva de herbicida.

Fotos: Antônio Marcos Coelho

Danos por poluentes atmosféricos

Caracterização do sintoma: em plantas, de um modo geral, os danos podem aparecer como necroses (“queimas”), amarelecimento ou descoloração precoce de folhas, morte de brotos e de floradas e alteração do crescimento, podendo afetar a produtividade. As injúrias podem ser agudas ou crônicas.

Condições de manifestação: as injúrias causadas por poluição dependem do poluente em questão e podem ser confundidas com inúmeros outros agentes, como doenças e ataques de pragas, danos por herbicidas, desordens nutricionais, senescência natural e efeitos de condições climáticas adversas. Os poluentes

considerados mais importantes são o ozônio, o dióxido de enxofre, os cloretos, fluoretos, peróxido-acetil nitratos e etileno.

Uma indicação importante para a identificação correta de danos por poluentes é a proximidade com as fontes poluidoras potenciais, como os centros urbanos, fábricas, refinarias, aeroportos e estradas com tráfego intenso de veículos. Entre os fatores que podem determinar a gravidade dos danos estão a distância da fonte poluidora, o tipo e a concentração do agente poluente, a extensão da exposição e as condições meteorológicas (SIKORA; CHAPPELKA, 2004).

Retirada de espigas antes da maturação (interferência humana)

Caracterização do sintoma: plantas em fase de produção com folhas vermelhas (“bicho-pamonha”) (Figura 17).





Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato



Figura 17. Folhas avermelhadas em decorrência da retirada da espiga.

Foto: Antônio Marcos Coelho

Condições de manifestação: retirada de espigas “bicho-pamonha” para consumo como milho-verde.

Causas genéticas

Descolorações foliares

Caracterização do sintoma: folhas com coloração amarelo-pálido e presença de clorose (amarelecimento) entre as nervuras das folhas novas (Figura 18).



Figura 18. Clorose internerval nas folhas e descoloração apresentadas pelo milho por causa de fatores genéticos.

Foto: Antônio Marcos Coelho

Condições de manifestação: genético, tem sido observado em condições de campo que alguns híbridos de milho apresentam nas folhas superiores (acima da espiga) clorose internerval que não se caracteriza como uma deficiência nutricional ou sintoma de doença.

Sintomas de doenças sistêmicas causadas por mollicutes e por vírus

Enfezamento-pálido

Caracterização dos sintomas: são sintomas típicos e inequívocos dessa doença a presença, nas folhas da planta de milho afetada, de estrias cloróticas (esbranquiçadas), irregulares, que se estendem da base em direção ao ápice da folha (Figura 19).





Figura 19. Enfezamento-pálido (*Spiroplasma kunkelli*).

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Alternativamente, podem ocorrer apenas clorose e avermelhamento nas margens e na parte apical da folha, iniciando-se a descoloração das margens na parte basal da folha, e essa descoloração pode tornar-se ou não avermelhada e a lâmina foliar pode apresentar aspecto clorótico. Frequentemente, observa-se que o avermelhamento na parte apical da folha ocorre com aparência de listras entre as nervuras.

Geralmente, os sintomas foliares dessa doença manifestam-se após o florescimento da planta e ocorrem associados ao encurtamento dos internódios, ou à drástica redução na altura da planta e à formação de espigas pequenas, isoladas ou em proliferação, com grãos que não completam o enchimento, ou com grãos cheios, mas esparsos no sabugo. Não é possível diagnosticar essa doença na fase inicial das plântulas, embora não seja incomum a presença de cartucho esbranquiçado, sintoma que desaparece rapidamente. Primeiro as margens das folhas, depois as folhas e a planta de milho inteira secam (COSTA et al., 1971; BASCOPE, 1977; NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 1988 (NÃO SERIA 1998?); MASSOLA JÚNIOR, 1998).

Condições de manifestação: os sintomas dessa doença se manifestam em decorrência da infecção sistêmica da planta por *Spiroplasma kunkelii*, patógeno que é transmitido pela cigarrinha *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), de maneira persistente-propagativa, e que infecta as plântulas de milho nos estádios iniciais de desenvolvimento, multiplicando-se nos tecidos do floema (DAVIS; WORLEY, 1973; NAULT, 1980).

A intensidade dos sintomas dessa doença é influenciada, essencialmente, pelo nível de suscetibilidade do genótipo de milho, pela idade em que a planta é infectada, e pela temperatura-ambiente, sendo tanto mais acentuada quanto maior a suscetibilidade do genótipo, quanto mais jovem for infectada a plântula, e quanto mais alta a temperatura ambiente, sendo favorecida por médias de temperaturas noturnas acima de 17 °C e diurnas em torno de 30 °C (OLIVEIRA et al., 2007, 2012; SABATO et al., 2013).

Enfezamento-vermelho

Caracterização do sintoma: os sintomas característicos dessa doença na planta de milho, comumente descritos na literatura, são o intenso avermelhamento foliar associado à proliferação de espigas pequenas e, em alguns genótipos, perfilhamento, nas axilas foliares e na base da planta. Contudo, alguns genótipos de milho, caracteristicamente, não apresentam avermelhamento, apenas clorose nas folhas (Figura 20).





Figura 20. Enfezamento-vermelho (fitoplasma MBS).

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Geralmente, os sintomas foliares dessa doença se manifestam após o florescimento da planta e ocorrem associados a algum encurtamento dos internódios, e à formação de espigas pequenas, isoladas ou em proliferação, com grãos cheios, porém esparsos no sabugo. A planta de milho doente seca rapidamente, especialmente quando a temperatura ambiente é alta (25 °C noite e 30 °C dia). Não é possível diagnosticar essa doença na fase de plântulas, embora possa ocorrer esbranquiçamento do cartucho, sintoma que desaparece em poucos dias (COSTA et al., 1971; BASCOPÉ, 1977; NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 1998; MASSOLA JÚNIOR, 1998).

Condições de manifestação: os sintomas dessa doença se manifestam em decorrência da infecção sistêmica da planta por um fitoplasma (*Maize bushy stunt* – MBS), patógeno esse que é transmitido pela cigarrinha *D. maidis*, de maneira persistente-propagativa, e que infecta a plântula de milho nos estádios iniciais de desenvolvimento, multiplicando-se nos tecidos do floema (NAULT, 1980; BEDENDO et al., 1997).

A intensidade dos sintomas dessa doença é influenciada, essencialmente, pela idade em que a planta é infectada, e pela temperatura ambiente, sendo tanto mais acentuada quanto mais jovem a plântula for infectada, e quanto mais alta a temperatura, sendo favorecida por temperaturas noturnas acima de 17 °C e diurnas em torno de 30 °C (NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 2007).

Virose mosaico-comum

Caracterização do sintoma: os sintomas característicos dessa virose são áreas cloróticas entremeadas por áreas de cor verde, em padrão de mosaico, claramente visíveis nas folhas das plântulas de milho, que tendem a desaparecer nas folhas das plantas adultas, dificultando a visualização e a identificação (Figura 21). Embora possa ocorrer essa recuperação dos sintomas, que se tornam difíceis de serem visualizados nas folhas da planta adulta, não ocorre recuperação do dano que a doença causa, e a espiga produzida pela planta afetada pode ter o tamanho reduzido, e falhas na formação dos grãos, sendo a intensidade desse dano variável em função da espécie de vírus que infecta a planta, e da idade em que a plântula foi infectada.



Figura 21. Sintomas da virose mosaico-comum.

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Condições de manifestação: essa virose pode ser causada por seis espécies de vírus do gênero *Potyvirus* (nome comum potyvírus), que têm sido identificadas e descritas em nível mundial, e que infectam numerosas espécies vegetais da família Poaceae. No Brasil, a espécie *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) tem sido comumente encontrada infectando o milho (ver Capítulos [14](#) e [15](#)).

Esses potyvírus são transmitidos de maneira semipersistente por afídeos, sendo o pulgão--do-milho, *Ropalosiphum maidis* (Hemiptera: Aphididae), altamente eficiente na sua disseminação nas lavouras de milho. Como esses potyvírus infectam muitas espécies de gramíneas perenes, ou semiparentes, e, em geral, os pulgões são polípagos, quando esses hospedeiros alternativos se encontram vegetando nas imediações de áreas onde o milho é

cultivado, podem atuar como reservatório e fonte de inóculo dos potyvírus para essa cultura.

Maize rayado fino virus

Caracterização do sintoma: os sintomas característicos dessa virose podem ser observados nas folhas de plântulas e de plantas de milho, em qualquer idade. Caracterizam-se pela presença de pequenos pontos cloróticos ao longo das nervuras das folhas, que assumem o aspecto de riscas finas e que, no cartucho das plântulas, podem ser percebidas como riscas que se alongam da base em direção à ponta da folha (Figura 22). Os pontos cloróticos e as riscas podem ser mais nitidamente visualizados posicionando-se a lâmina foliar contra a luz do sol. Em geral, as plântulas de milho são infectadas por esse vírus nos estádios iniciais de desenvolvimento, e em poucos dias (cerca de 2 semanas) manifestam esses sintomas característicos, que perduram, podendo ser identificados até o final do ciclo da planta (KITAJIMA, 1979; GÁMEZ, 1980).

<



Figura 22. *Maize rayado fino virus.*

Foto: Elizabeth de Oliveira Sabato

Condições de manifestação: essa virose é causada por *Maize rayado fino virus* (MRFV), que é transmitido de maneira persistente pela cigarrinha *D. maidis* e, sendo esse inseto-vetor o mesmo que transmite para o milho os mollicutes *S. kunkelii* e MBS-fitoplasma, pode ocorrer simultaneamente na mesma planta afetada pelos enfezamentos causados por esses outros agentes patogênicos.

Como diferenciar as causas dos sintomas

A realização de um diagnóstico pressupõe uma ampla identificação do problema e de suas causas e consequências. Para isso, é sempre importante adotar procedimentos sistemáticos para

observações e análises in loco, e para coletar e preservar amostras de materiais para análises específicas em laboratório, quando for o caso, e registrar informações referentes à situação em análise e ao seu histórico.

Em uma lavoura de milho, quando são encontradas plantas apresentando sintomas de anormalidades, seja nas folhas, no colmo, ou nas espigas, e/ou na formação e enchimento dos grãos, é essencial observar primeiro a frequência e o padrão de distribuição das plantas sintomáticas na área. As plantas sintomáticas podem se encontrar concentradas em determinada área na lavoura, e, neste caso, é importante observar se há declives e baixadas que possam influenciar a drenagem da água, e a posição da(s) área(s) afetada(s) em relação aos desníveis, ou se a área é relativamente uniforme. É importante observar também (quando o problema é primeiro identificado na espiga) se há um padrão de descolorações, de seca ou de murcha das folhas, predominantemente associado à má formação da espiga. Da mesma forma, quando o problema é detectado nas plantas em fase vegetativa é importante avaliar a frequência e distribuição das plantas sintomáticas na lavoura de milho.

De forma geral, plantas sintomáticas concentradas em pequenas áreas ou “reboleiras”(Figura 23) sugerem à primeira vista que o fator determinante se localiza no solo. Porém, é importante analisar outros fatores, como direção do vento, forma de aplicação de produtos, adensamento do solo, encharcamento, locais onde se despeja o calcário para distribuição na área, etc.





Figura 23. Sintomas em plantas de milho ocorrendo em pequenas manchas na área, pela variação espacial nas propriedades físicas e químicas do solo.

Fotos: Antônio Marcos Coelho

Plantas com descolorações foliares características, ao acaso na área, sugerem possível doença sistêmica causada por agentes disseminados por insetos. Por outro lado, quando os sintomas ocorrem de maneira uniforme, em todas as plantas na lavoura, pensa-se primeiro em efeitos abrangentes de deficiência nutricional ou condições climáticas (temperatura, deficiência ou excesso hídrico).

A identificação da(s) cultivar(es) em análise, o histórico das práticas e produtos utilizados, da existência de cultura anterior no local e possível uso anterior de produtos fitossanitários, bem como a inspeção de outras lavouras possivelmente existentes nas imediações, além de informações sobre as condições climáticas predominantes, são muito importantes para a identificação da possível causa do problema. Não é possível fazer diagnóstico baseado apenas em fotografias, mas elas ajudam a levantar hipóteses para possíveis causas.

Realizado o diagnóstico no campo, pode ser importante coletar amostras de folhas e de solo (caso não existam resultados), para análise em laboratório e confirmação. Para a detecção dos agentes patogênicos relacionados neste capítulo, há necessidade de amostras de tecido fresco das folhas; para análise do teor de nutrientes, as amostras de folhas podem ser secas ao sol acondicionadas em sacos de papel.

Referências

- ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; GOULART, P. F. P.; DANTAS, B. F.; GOUVÊA, J. A.; PURCINO, R. P.; MAGALHÃES, P. C.; FRIES, D. D.; LIVRAMENTO, D. E.; MEYER, L. E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho “Saracura” (BRS 4154) ao alagamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 1, p. 41-52, 2002.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO SETOR DE FERTILIZANTES. São Paulo: ANDA, 2013. 178 p.
- BASCOPE, Q. J. B. **Agente causal de la llamada “raza mesa central” del achaparramiento del maiz**. 1977. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Escuela Nacional de Agricultura, Colégio de Postgraduados, Chapingo.
- BEDENDO, I. P.; DAVIS, R. E.; DALLY, E. L. Molecular evidence for the presence of maize bushy stunt phytoplasma in corn in Brazil. **Plant Disease**, v. 81, p. 957, 1997.
- COELHO, A. M. Diagnose foliar em milho e sorgo. In: PRADO, R. de M.; ROZANE, D. E.; VALE, D. W. do; CORREIA, M. A. R.; SOUZA, H. A. de (Ed.). **Nutrição de plantas: diagnose foliar em grandes culturas**. Jaboticabal: UNESP: GENPLANT, 2008. p. 179-192.
- COELHO, A. M. Maize and brachiaria intercropping system efficiency in the use of soil phosphorus reserves. In: WORLD FERTILIZER CONGRESS OF CIEC, 16., 2014, Rio de Janeiro. **Technological innovation for a sustainable tropical agriculture: proceedings**. Rio de Janeiro: International Scientific Centre of Fertilizers, 2014. p. 368-370.
- COELHO, A. M.; COELHO FILHO, A. Adubação foliar da cultura do milho utilizando produtos multinutrientes. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 2.; SIMPÓSIO SOBRE COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA, 1., 2006, Belo Horizonte. **Inovação para sistemas integrados de produção: trabalhos apresentados**. [Sete Lagoas]: ABMS, 2006. 1 CD-ROM.
- COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. de. Nutrição e adubação. In: SEJA o doutor do seu milho. 2. ed. aum. Piracicaba: POTAFOS, 1995. p. 1-9. (Arquivo do Agrônomo, 2).
- COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma no milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, n. 4, p. 39-41, 1971.
- DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F. Spiroplasma: motile, helical microorganism associated with corn stunt diseases. **Phytopathology**, v. 63, p. 403-408, 1973.
- DELL, B.; HUANG, L. Physiological response of plants to low boron. **Plant and Soil**, v. 193, p. 103-20, 1997.

DEWEY LEE, R. (Ed.). **The Georgia corn diagnostic guide**: a comprehensive guide for troubleshooting problems in corn. Athens, GA: The University of Georgia, 2012. (Bulletin 1221).

FOLONI, J. S. S.; CANOLEGO, J. C.; LIMA, S. L. de. Efeito da compactação do solo no desenvolvimento aéreo e radicular de cultivares de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 947-953, 2003.

FREDDI, O. S. da; CENTURION, J. F.; BEUTLER, A. N.; ARATANI, R. G.; LEONEL, C. L. Compactação do solo no crescimento radicular e produtividade da cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 627-636, 2007.

GÁMEZ, R. **Maize rayado fino virus**. Wageningen: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1980. (Descriptions of plant viruses, 220).

GOMES, L. S.; BRANDÃO, A. M.; BRITO, C. H.; MORAES, D. F.; LOPES, M. T. G. Resistência ao acamamento de plantas e ao quebraamento do colmo em milho tropical. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 140-145, 2010.

KITAJIMA, E. W. Citopatologia e localização de vírus do milho e de leguminosas alimentícias nas plantas infectadas e nos vetores. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 241-254, 1979.

MARSCHNER, H. Diagnosis of deficiency and toxicity of mineral nutrients. In: MARSCHNER, H. (Ed.). **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1997. p. 461-479.

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

MOZAFAR, A. Effect of boro on ear formation and yield components of two maize (*Zea mays* L.) hybrids. **Journal Plant Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 319-32, 1987.

NAULT, L. R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, v. 70, n. 7, p. 659-662, 1980.

NAVEED, S.; ASLAM, M. M.; MAQBOO L. A.; BANO, S.; ZAMAN, Q. U.; AHMAD, R. M. Physiology of high temperature stress tolerance at reproductive stages in maize. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 24, n. 4, p. 1141-1145, 2014.

NIELSEN, B. **Stalk lodging in corn**: guidelines for preventive management. West Lafayette: Purdue Extension Cooperative Service, 1988.

OLIVEIRA, E.; LANDAU, E. C.; OLIVEIRA, C. M. Maize bushy stunt phytoplasma in Brazil. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2012.

OLIVEIRA, E.; SANTOS, J. C.; MAGALHÃES, P. C.; CRUZ, I. Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affect by spiroplasma acquisition and environmental conditions. **Bulletin of Insectology**, v. 60, n. 2, p. 229-230, 2007.

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, W. E. Enfezamento pálido e enfezamento vermelho na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 45-47, 1998.

SABATO, E. O.; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T. **Identificação e controle de doenças do milho**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2013. 145 p.

SHAW, R. H.; NEWTON, J. E. **Weather stress in corn crop**. West Lafayette: Purdue Extension Cooperative Service, 1991.

SIKORA, E. J.; CHAPPELKA, A. H. **Air pollution damage to plants**. [S.l.]: Alabama Cooperative Extension System, 2004. ANR-913.

VILELA, L.; RITCHEY, K. D.; PERES, J. R. R.; SILVA, J. E. da. Efeito residual e resposta a doses de magnésio num Latossolo Vermelho-Escuro argiloso de cerrado. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados. **Relatório técnico anual do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados 1982/1985**. Planaltina, DF, 1987. p. 139-140.

Capítulo 19

Tecnologias moleculares para controle de doenças em milho

Newton Portilho Carneiro | Andrea Almeida Carneiro



Introdução

O milho é um dos cereais mais cultivados mundialmente, com aproximadamente um bilhão de toneladas produzidas na safra de 2014/2015 (SOLOGUREN, 2015). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, ficando atrás somente dos Estados Unidos e da China. Outros grandes produtores de milho são México, França, Argentina e Índia. O milho é um cereal empregado principalmente como ração animal, mas a indústria vem aumentando a sua

utilização como insumo na fabricação de mais de uma centena de produtos, tais como xarope de glicose, bebidas, medicamentos, maltodextrinas, corantes, adesivos, fitas gomadas, tintas, plásticos, explosivos, etanol combustível, entre outros (STRAZZI, 2015). Assim, considerada como uma importante cultura para as necessidades atuais impostas pela sociedade moderna, a demanda de consumo e de mercado de milho vem sofrendo contínuo aumento, tanto em níveis nacionais como mundiais.

A produção de milho no Brasil até início do novo milênio era feita principalmente durante a primeira safra ou safra de verão. Atualmente mais de 50% da produção é obtida na segunda safra (BARROS; ALVES, 2015). Este aumento nas áreas produtoras de milho durante todo o ano agrícola vem agravando problemas com pragas e doenças. Para sobreviver a esses estresses, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos para proteção contra patógenos, tais como barreiras físicas, metabólicos secundários e proteínas antimicrobianas. Contudo, nem sempre o sistema de defesa é eficaz ou disponível em genótipos produtivos. Assim, nos últimos anos, doenças que antes eram problemas secundários ou esporádicos vêm crescendo em importância, como é o caso das viroses e dos enfezamentos causados por mollicutes (fitoplasmas e espiroplasmas). Nesse contexto, torna-se fundamental o desenvolvimento de estratégias que levem a uma maior produção e adaptação de culturas economicamente importantes ao ataque de pragas e doenças. Neste capítulo, serão discutidos alguns métodos biotecnológicos para o controle de vírus e mollicutes de milho e prováveis processos que podem contribuir com resultados positivos em um futuro breve.

Aspectos moleculares de vírus e mollicutes presentes na cultura do milho

No Brasil, estão descritas três viroses principais para o milho: o mosaico-comum, que pode ser causado por quatro potyvírus distintos, transmitidos mecanicamente e por pulgões, principalmente pelo pulgão do milho, *Rhopalosiphum maidis*; a virose causada pelo *Maize rayado fino virus* (MRFV) e transmitida pela cigarrinha *Dalbulus maidis* (DeLong & Wocott) (Hemiptera: Cicadellidae); e a faixa clorótica das nervuras, causada pelo *Maize mosaic virus* (MMV), transmitido pela cigarrinha *Peregrinus maidis* (WAQUIL et al., 1996).

As partículas de potyvírus causadoras do mosaico são flexíveis e têm um comprimento aproximado de 750 nm por 12 nm a 13 nm (SHUKLA et al., 1994). Como na maioria dos vírus de plantas, os potyvírus têm um genoma consistindo de fita senso RNA positivo com aproximadamente 10 mil nucleotídeos e uma proteína terminal 5' denominada VPG (Figura 1).

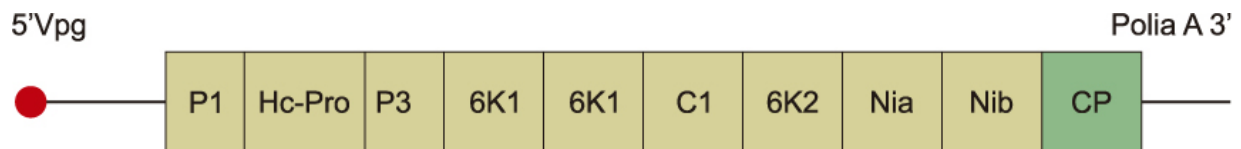


Figura 1. Representação esquemática da organização de genes de um potyvírus: P1, protease 1; HC-Pro, componente auxiliar da protease; P3, protease 3; C1, helicase de RNA; 6K1 e 6K2, peptídeos; Nia, protease de inclusão nuclear; Nib, polimerase dependente de RNA; e CP, capa proteica. O Vpg pode servir como primer para a síntese do vRNA, estabilidade do mRNA a ataque de exonucleases.

Fonte: Shukla et al. (1994).

Plantas resistentes a doenças podem ser geradas via transformação genética utilizando genes de resistência derivados de patógenos (PDR – *Pathogen-derived resistance*) e não patogênicos (*non PDR*) (DASGUPTA et al., 2003). Para os PDR, parte ou o genoma viral completo é introduzido na planta e interfere em um ou mais passos do ciclo do vírus. O conceito de PDR tem gerado interesse e hoje existem vários sistemas hospedeiros de vírus que estão completamente estabelecidos. A resistência derivada de não PDR é baseada na utilização de genes de resistência de hospedeiros ou outros genes adaptativos que são ativados em resposta ao ataque do patógeno.

Mollicutes são as formas mais simples de vida e o estudo dos seus genes 16S rRNA mostrou que estes organismos foram originados de bactérias. Os mollicutes consistem em cerca de 200 espécies sistematicamente bem definidas. Em plantas existem os fitoplasmas e os espiroplasmas. Fitoplasmas e espiroplasmas (Filo: Firmicutes, Classe Mollicutes) são organismos fitopatogênicos semelhantes às bactérias e transmitidos por insetos. Mollicutes não possuem parede celular, e vivem endocelularmente no inseto e no floema de plantas. Suas vias metabólicas e interação com o hospedeiro são de grande interesse para a agricultura, contudo, as limitações para cultivar esses organismos *in vitro* têm dificultado a caracterização molecular e determinação de fatores envolvidos na patogenicidade e descobertas de novas vias para o controle dessa doença em plantas.

Há cerca de 20 anos, os trabalhos moleculares se concentraram em detectar, identificar e classificar os fitoplasmas. Na mesma época houve avanços na descrição do genoma, no entendimento dos mecanismos causadores da doença, nos estudos das infecções

causadas por misturas de fitoplasmas e na compreensão dos fenômenos genéticos moleculares do desenvolvimento dos sintomas nas plantas. Esse e outros avanços mais recentes estabeleceram uma base para o entendimento dos mecanismos da patogenicidade do fitoplasma e de novos processos para alcançar controle efetivo das doenças.

O sequenciamento do genoma de quatro estirpes de fitoplasma mostrou que o DNA desses organismos consiste em um cromossoma de aproximadamente 860 Mb e dois cromossomas adicionais menores. Os cromossomas têm conteúdo GC de 28% e 754 genes (ORFs), correspondendo a 73% do genoma. Cerca de 70% dessas ORFs têm homologia significativa com o GenBank (OSHIMA et al., 2004). Apesar do conhecimento do genoma de alguns fitoplasmas, não foram encontrados trabalhos mostrando métodos moleculares eficientes para o seu controle.

Atualmente, tanto o controle de vírus quanto de mollicutes é realizado através da utilização de cultivares resistentes, do plantio em épocas mais apropriadas e com eliminação de plantas hospedeiras, entre outros métodos. Em seguida, serão mencionadas técnicas moleculares como o RNAi e o CRISPR e suas possíveis aplicações no controle de vírus e mollicutes.

Utilização da biotecnologia para o controle de doenças em milho

RNA interferente é um processo de regulação gênica pós-transcricional que ocorre em células eucarióticas de diversos

organismos. A regulação ocorre através da degradação dos transcritos de um determinado gene de sequências semelhantes às das moléculas de dupla fita de RNA (dsRNA), que pode ter origem tanto interna quanto externa.

Antes da descoberta do RNAi, os mecanismos de silenciamento gênico já haviam sido observados. Em 1990, Napoli e colaboradores superexpressaram o gene da chalcone sintase em petúnias na tentativa de regular sua expressão e conseguir flores de um lilás escuro intenso (NAPOLI et al., 1990). Os resultados mostraram uma perda de função inesperada que foi denominada cossupressão, ao invés de flores escuras foram obtidas flores brancas. Em 1992, outros grupos mostraram o mesmo fenômeno em *Neurospora crassa* (PANDIT; RUSSO, 1992; ROMANO; MACINO, 1992) e *Caenorhabditis elegans* (GUO; KEMPHUES, 1995). Fire et al. (1998), baseando-se nesses resultados e em novos experimentos, descreveram o fenômeno de silenciamento gênico intermediado por RNAi. Esse grupo introduziu fitas senso e antissenso de RNA em experimentos independentes, em *C. elegans*, e os resultados mostraram um silenciamento gênico 10 vezes maior quando as duas fitas estavam presentes no verme comparado a quando as fitas eram introduzidas separadamente. Na realidade, a introdução de ambas as fitas cria um dsRNA, que é a molécula sinal para ativação do processo de degradação gênica pelo RNAi. Mais tarde, o mesmo fenômeno foi descrito em tripanossomas (NGO et al., 1998) e em moscas (KENNERDELL; CARTHEW, 1998). Em razão do grande interesse despertado por esta tecnologia e pelas suas possíveis aplicações, vários grupos de pesquisa trabalharam no desvendamento dos mecanismos envolvidos nesse processo. O complexo enzimático DICER que cliva o dsRNA em unidades menores de RNAi foi descrito por Bernstein et al. (2001) em

Drosophila. Este complexo pertencente à família das RNases III tem 4 domínios: a) uma helicase N-terminal helicase; b) uma RNase III; c) um domínio que se liga no terminal C do dsRNA; e d) um domínio conhecido como PAZ (Piwi/Argonaute/Zwill) (AGRAWAL et al., 2003). Os siRNAs possuem um terminal 3' de uma base adicional, e Wei et al. (2003) identificarem que o grupo hidroxil 3' era necessário para direcionar o RNAi in vitro. O domínio PAZ do complexo DICER parece interagir fisicamente com o domínio PAZ do complexo RISC. O processamento do dsRNA pelo complexo DICER/RISC é mostrado na Figura 2.

diferenças de nucleotídeos que permitiriam maior variabilidade de modulação comparado com os smRNA, que requerem sequências mais similares.

Ilustração: Newton Portilho Carneiro.

Com a tecnologia do RNAi foi possível o silenciamento de múltiplos genes inserindo construções gênicas específicas em plantas de interesse. O RNAi pode também fornecer amplo espectro de proteção contra patógenos com alto grau de variabilidade como acontece com os vírus. Estratégias antivirais semelhantes ao sistema de silenciamento via RNAi foram inicialmente demonstradas para o vírus da batata e, em seguida, para os vírus do tabaco, da abobrinha, do tomate (*Tomato Spotted Wilt Virus*), do feijão (*Bean Golden Mosaic Virus*), da banana (*Banana Bract Mosaic Virus*), do arroz (*Rice Tungro Bacilliform Virus*), entre outros (INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS, 2016).

Apesar de muito progresso já ter sido feito com relação ao entendimento dos mecanismos que regulam a produção de RNA de interferência nos últimos anos, o potencial dessa técnica está longe de ser atingido. A complexidade das vias do RNAi, os mecanismos moleculares e seu comportamento durante o desenvolvimento de uma planta ainda estão para ser elucidados.

Um sistema eficiente para produção de dsRNA foi desenvolvido em bactérias (GAN et al., 2010) e usado para testar o silenciamento gênico do vírus do mosaico-da-cana-de-açúcar (SCMV) em milho. Dois fragmentos da capa proteica do vírus SCMV, CP1 e CP2, foram amplificados por RT-PCR e clonados invertidos no vetor pUCCRNAi. Os dois plasmídeos gerados foram inseridos em uma estirpe de *E. coli* HT115 deficiente na produção da enzima RNA-III, e sua

expressão foi induzida por isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside (IPTG). Os dsRNA produzidos pela bactéria e aplicados na planta foram capazes de inibir o aparecimento da doença. Este experimento demonstrou a viabilidade de produção de dsRNA em *E. coli* HT115 e a possibilidade do silenciamento gênico quando este dsRNA está em contato com a planta infectada.

Apesar de o RNAi ser um processo desenvolvido pelas plantas para a defesa contra vírus, alguns destes vírus desenvolveram mecanismos para sobreviver a esse processo e serem bem-sucedidos na infecção. Para combater o mecanismo de defesa intermediado pelo silenciamento gênico, vírus codificam proteínas que têm a capacidade de bloquear vários passos do processo de silenciamento pelo RNAi (BECLIN et al., 1998; BRIGNETI et al., 1998; VOINNET et al., 1999; LLAVE et al., 2000). A proteína HC-Pro foi uma das primeiras a ser identificada. Inibição do silenciamento de RNA está associada com redução do acúmulo de siRNAs. Supressores virais têm sido identificados em muitas fitas positivas (BECLIN et al., 1998; BRIGNETI et al., 1998; VOINNET al., 1999), fitas negativas de vírus de RNA (BUCHER et al., 2003) e vírus de DNA (VOINNET et al., 1999).

Para a aplicação prática do processo de RNAi para o controle de viroses que atacam o milho é necessária uma construção gênica que irá originar dsRNA para o gene viral que será silenciado, e a sua integração no genoma da planta de interesse utilizando processos de transformação genética de plantas.

Construção gênica para controle de vírus em planta via RNAi

Para a produção de plantas geneticamente modificadas com o objetivo de caracterizar um fenótipo é necessário, além de uma construção gênica contendo o gene de interesse, um segundo cassete gênico contendo o gene marcador de seleção. Ambos os genes sob o controle de seus respectivos promotores e terminadores podem estar em um único plasmídeo ou separados em fragmentos lineares. Como será visto na seção a seguir, a transformação por agrobactéria utiliza um vetor binário que carrega o gene de interesse, e a transformação por biobalística pode utilizar tanto um vetor como apenas fragmentos não clonados para o transporte do gene de interesse.

A clonagem, tanto do gene de interesse como do gene marcador sob o controle dos promotores e terminadores apropriados, pode ser feita por enzima de restrição ou por síntese de toda a construção gênica. Em ambos os processos são necessárias confirmação da clonagem e sequências. Plantas geneticamente modificadas podem ser usadas para estudos de regiões regulatórias e nesse caso usa-se gene repórter para demonstrar a expressão dele espacialmente e temporalmente. O gene que codifica uma proteína que leve à tolerância da planta a um vírus pode ser de uma planta tolerante ou mesmo um fragmento baseado em RNAi.

Os genes marcadores de seleção são utilizados para seleção das plantas transgênicas. Sem esse elemento a seleção é extremamente difícil de ser realizada em razão da baixa eficiência do processo de transferência de um transgene para uma célula receptora e sua integração no genoma. Genes marcadores de

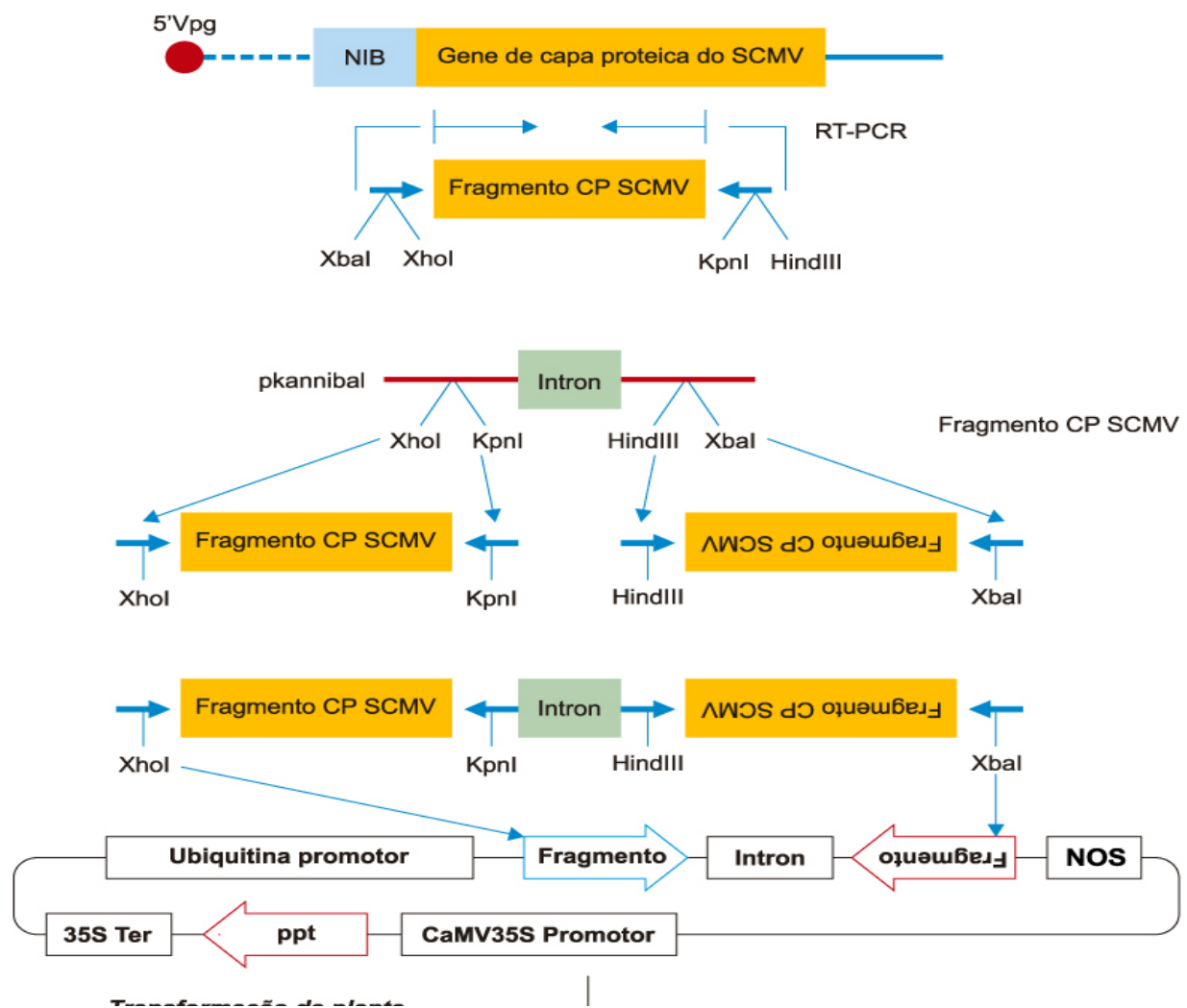
seleção mais utilizados para a produção de milho transgênico são os que conferem tolerância a herbicidas. Dentre estes, os genes *bar*, isolados de *Streptomyces hygroscopicus*, e o *pat*, isolado de *Streptomyces viridochromogenes*, ambos codificando a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) (DE BLOCK et al., 1989), são frequentemente citados (GORDON-KAMM et al., 1990; ZHAO et al., 2001; ISHIDA et al., 2007).

Promotores são sequências de DNA, normalmente presentes nas extremidades 5' de uma região codificadora, usadas pela RNA polimerase e fatores de transcrição para iniciar o processo de transcrição gênica (BUCHANAN et al., 2000). Os promotores mais utilizados para direcionar a expressão de uma proteína constitutivamente em milho são a ubiquitina de milho Ubi1 (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996) e o CaMV35S isolado do vírus do mosaico-da-couve-flor (ODELL et al., 1985).

As regiões terminadoras também conhecidas como 3' UTRs são utilizadas para sinalizar o término da transcrição (LESSARD et al., 2002), impedindo que ocorra a produção de moléculas quiméricas de RNA e, conseqüentemente, a formação de novas proteínas, se o complexo da polimerase continuar transcrevendo além do seu sinal de término. As sequências 3' UTRs mais utilizadas em construções gênicas para transformação de milho incluem o fragmento *nos* originado do gene nopaline sintase de *Agrobacterium* (DEPICKER et al., 1982), a região 3' do CaMV35S (FRAME et al., 2002), e a do gene inibidor de proteinase *pinII* de batata (AN et al., 1989).

Na maioria das vezes, o gene de interesse é uma sequência codificadora ou ORF (Open Reading Frame) de certa proteína que quando expressa define o fenótipo de interesse. No caso da tecnologia do RNAi, o gene não codifica uma proteína, mas inibe a

expressão de outro mRNA. Um importante aspecto da tecnologia do RNAi é a capacidade de decidir a região do gene que deve ser utilizada para uma produção eficiente do dsRNA e a especificidade com relação ao gene-alvo. Qualquer molécula de RNA que possua sequência similar à da original irá causar o silenciamento do mRNA. Não existem trabalhos especificando o tamanho mínimo de uma região usada para construção gênica baseada em RNAi, mas geralmente utiliza-se entre 300 e 800 bp. Uma vez os elementos do gene de interesse são incorporados no vetor esse é transformado em milho via agrobactéria ou biobalística. Uma representação esquemática da construção genética é mostrada na Figura 3.



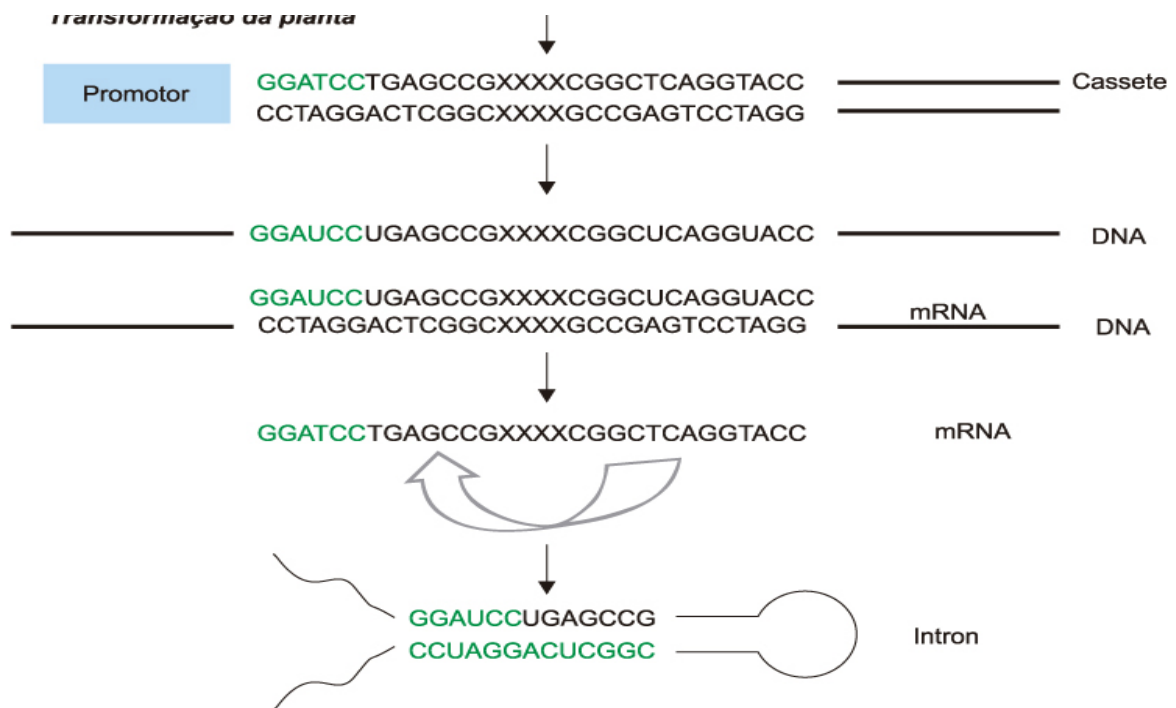


Figura 3. Diagrama da clonagem de um fragmento da capa proteica do SCMV em um vetor binário e o funcionamento do transcrito na célula vegetal. O fragmento da capa proteica do SCMV é amplificado por RT-PCR do vírus de RNA e clonado duas vezes no polilinker do plasmídeo pkannibal o qual apresenta uma região de intron. Esse cassete gênico contendo duas cópias do produto de PCR do SCMV intercalado pelo intron é clonado no vetor binário sob o controle de um promotor e terminador. O vetor binário, uma vez transformado na planta, é transcrito e é processado de forma semelhante ao descrito na Figura 2.

Ilustração: Newton Portilho Carneiro. Transformação genética de milho

Para a inserção de genes de interesse e criação de cultivares resistentes a doenças, diversos métodos de transformação genética foram descritos para a cultura do milho, dentre eles, a biobalística (SANFORD et al., 1987; KLEIN et al., 1992) e a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* são os mais empregados (FRAME et al., 2002; ISHIDA et al., 2007; VEGA et al., 2008). A transformação usando biobalística é baseada na inserção de micropartículas de ouro ou tungstênio revestidas com DNA no núcleo de plantas usando equipamentos especiais conhecidos como “gene gun” ou canhão gênico. Uma vez dentro da célula, a construção gênica pode se integrar no genoma da planta. Genótipo não é um fator limitante

em biobalística, o processo tem se mostrado efetivo desde a transformação de microrganismos até plantas e animais (SANFORD et al., 1993; CHRISTOU, 1995). Usando o método da biobalística, cereais como milho, arroz e trigo já foram transformados (BECKER et al., 1994; CARNEIRO et al., 2004). Algumas das vantagens em se usar a técnica da biobalística estão relacionadas com o tipo de fragmento a ser bombardeado, que nem sempre precisa estar clonado em um vetor, e com a facilidade de usar outros tecidos como, por exemplo, inflorescências, microsporos ou embriões imaturos (BARCELO et al., 1994; BECKER et al., 1994).

Por vários anos, a transformação de monocotiledôneas por *Agrobacterium* mostrou baixa eficiência, no entanto isso tem mudado nos últimos anos. Essa bactéria possui um plasmídeo denominado Ti (Tumor inducer) capaz de codificar proteínas responsáveis pela transferência do T-DNA para a célula vegetal. Transformação via *A. tumefaciens* apresenta diversas vantagens em comparação com a biobalística, em função do menor número de cópias do transgene inseridas no genoma, dos poucos rearranjos das moléculas de DNA introduzidas e da maior estabilidade fenotípica durante muitas gerações (ISHIDA et al., 1996). Uma vez esses fragmentos são incorporados no genoma, a confirmação da transformação pode ser realizada por PCR utilizando primers específicos para regiões presentes na construção gênica.

Uso de RNAi para controle de insetos-vetores de vírus e mollicutes

Outra estratégia de manejo de doenças causadas por vírus e mollicutes é o controle dos insetos-vetores. A tecnologia do RNAi também pode ser utilizada para o controle destes insetos, para tanto, genes vitais para o inseto precisam ser identificados. Esta identificação é realizada através do sequenciamento de transcriptomas de diferentes fases e tecidos do inseto, uma próxima etapa é a identificação de regiões dentro desses genes candidatos que tenham maior estabilidade para a produção do dsRNA (softwares públicos estão disponíveis). Esses fragmentos são amplificados por PCR utilizando primers específicos e clonados em vetores de expressão de RNA in vitro (disponível comercialmente) para produzirem dsRNA. Os dsRNAs produzidos in vitro são aplicados, em concentrações conhecidas, na dieta do inseto-alvo para determinar a eficiência da mortalidade em função de um controle conhecido. Uma etapa importante para o sucesso do uso comercial de produtos baseados na tecnologia de RNAi para o controle de insetos-vetores é a confirmação da especificidade do dsRNA produzido para o controle do inseto-alvo. Isso pode ser previsto no início do processo através de comparação das sequências dos genes candidatos do inseto-alvo com outros insetos não alvos utilizando banco de dados gênicos públicos. Contudo, são necessários dados experimentais para a confirmação da especificidade.

RNAi para controle de insetos-pragas está se tornando uma nova abordagem para o manejo de importantes insetos-pragas em plantas cultivadas. Utilização de múltiplos genes-alvos poderia fortalecer ainda mais os resultados desta tecnologia. O número de genomas de insetos sequenciados vem aumentando continuamente e a comercialização de produtos baseados em RNAi para controle

de inseto será voltada para a identificação de genes-alvos que possam matar a praga ou inibir a toxina produzida por essa.

Plantas têm sido geneticamente modificadas para produzir dsRNA que silenciam genes dos insetos-pragas e de nematoides parasitas. O controle de insetos-pragas por ingestão de dsRNA foi demonstrado pela primeira vez em *C. elegans* (TIMMONS et al., 2001) e tem sido testado em um grande número de espécies de insetos. A maioria dos experimentos realizados com RNAi para verificar a eficiência no controle do inseto-alvo utiliza concentrações que variaram de 1 mg a 100 mg de dsRNA, sendo que foi verificada uma maior eficiência da técnica para o controle de insetos de maior porte (TERENIUS et al., 2011). A partir dos diferentes métodos de aplicações, a adição de dsRNA na dieta parece ser o método mais atraente em razão de sua facilidade, de ser menos invasivo, ter baixo custo, economia de tempo e, acima de tudo, de ser um método natural. O sucesso de RNAi por ingestão do dsRNA no controle de inseto depende principalmente do gene e do tecido-alvo. Os mecanismos para a entrada de dsRNA em insetos foram revisadas por Huvenne e Smagghe (2010).

Um dos casos de maior sucesso do uso de RNAi no controle de insetos foram os trabalhos com alimentação de larvas de *Diabrotica virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidade) com uma dieta artificial complementada com dsRNAs específicos. Os resultados mostraram uma diminuição da expressão do gene de interesse que provou ser letal para as larvas e, conseqüentemente, reduziu danos na raiz no milho transgênico. Estas plantas de milho transgênicas que produziam dsRNA da subunidade do gene H⁺-ATPase vacuolar, presente no intestino do inseto, mostraram ser eficientes no controle de *D. virgifera* (BAUM et al., 2007).

Trabalhos utilizando a tecnologia do RNAi têm sido realizados com o silenciamento de genes de insetos sugadores vetores de vírus e mollicutes, contudo, até o momento, poucos resultados foram obtidos. A cigarrinha (*Dalbulus maidis*) é um dos vetores de agentes causais de doenças do milho, como o MRFV e os mollicutes *Spiroplasma kunkelli* (enfazamento--pálido) e fitoplasma (enfazamento-vermelho). A incidência das doenças está associada à alta densidade populacional de insetos infectados, o que ocorre no final do verão (plantios tardios). Também causa danos diretos ao milho pela sucção de seiva pelos adultos e ninfas. Trabalhos mostram o efeito do gene Vacuolar-ATPase (V-ATPase), responsável pela hidrólise do ATP e pelo transporte de prótons para fora das células, mantendo o balanço iônico em vários insetos. Em um estudo com *P. maidis*, regiões dos genes de V-ATPase B e V-ATPase D foram utilizadas para produção de dsRNA e entregues por via oral e microinjeção. Para os experimentos de injeção, foi verificado por PCR uma redução da expressão do gene original. Essa redução de expressão do gene V-ATPase foi suficiente para gerar uma alta mortalidade e uma baixa fecundidade, comparando-se com insetos tratados com dsRNA do gene controle GFP (*Green Fluorescent Protein*). Esses resultados mostraram a possibilidade da utilização da técnica do RNAi para controle de insetos-vetores de doenças em diferentes culturas, incluindo o milho.

Mesmo sendo um processo bastante simples e inovador, ainda existem muitas perguntas que precisam ser respondidas antes que esta tecnologia se torne disponível comercialmente, principalmente com relação à mobilidade e à estabilidade dos dsRNAs na planta e no inseto, para a demonstração de que esse processo é eficiente no controle de insetos-pragas.

Novas tecnologias de CRISPR para controle de vírus e mollicutes

A tecnologia de edição de genoma, conhecida como *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), também poderia ser usada para o controle de vírus de DNA e mollicutes em plantas. A tecnologia CRISPR baseia-se em provocar mutações de inserção ou deleção de poucas bases, em sequências específicas do DNA-alvo. Esta edição do genoma pode ocorrer tanto no DNA endógeno da célula vegetal quanto em qualquer outro DNA que venha contaminar a célula. Esse processo foi identificado no sistema de defesa de bactérias a bacteriófagos. Evolutivamente, bactérias resistentes a bacteriófagos foram incorporando sequências desses vírus e passaram a transcrevê-las juntamente com sequências codificadoras de endonucleases, formando um complexo capaz de destruir o DNA do bacteriófago. Esse sistema foi esclarecido por pesquisadores ao longo dos últimos 20 anos e sua aplicação na edição de genomas para um grande número de finalidades e organismos. Em plantas, a tecnologia CRISPR tem sido usada tanto para causar pequenas deleções ou inserções, conhecidas quanto indels, até inserção de genes em locais pré-determinados, por recombinação homóloga. Este sistema consiste em expressar nas células de interesse uma nuclease (Cas9) e um RNA quimérico, conhecido como RNA guia ou gRNA. Esse complexo contendo a nuclease Cas9 e o gRNA reconhece a região específica do DNA através de uma região variável de 20 nucleotídeos presente no gRNA (BORTESI; FISCHER, 2014). O gRNA apresenta uma região que é reconhecida pela endonuclease e outra região capaz de reconhecer a região do DNA da planta que

será mutada. Um esquema simplificado do funcionamento da tecnologia CRISPR é mostrado na Figura 4.

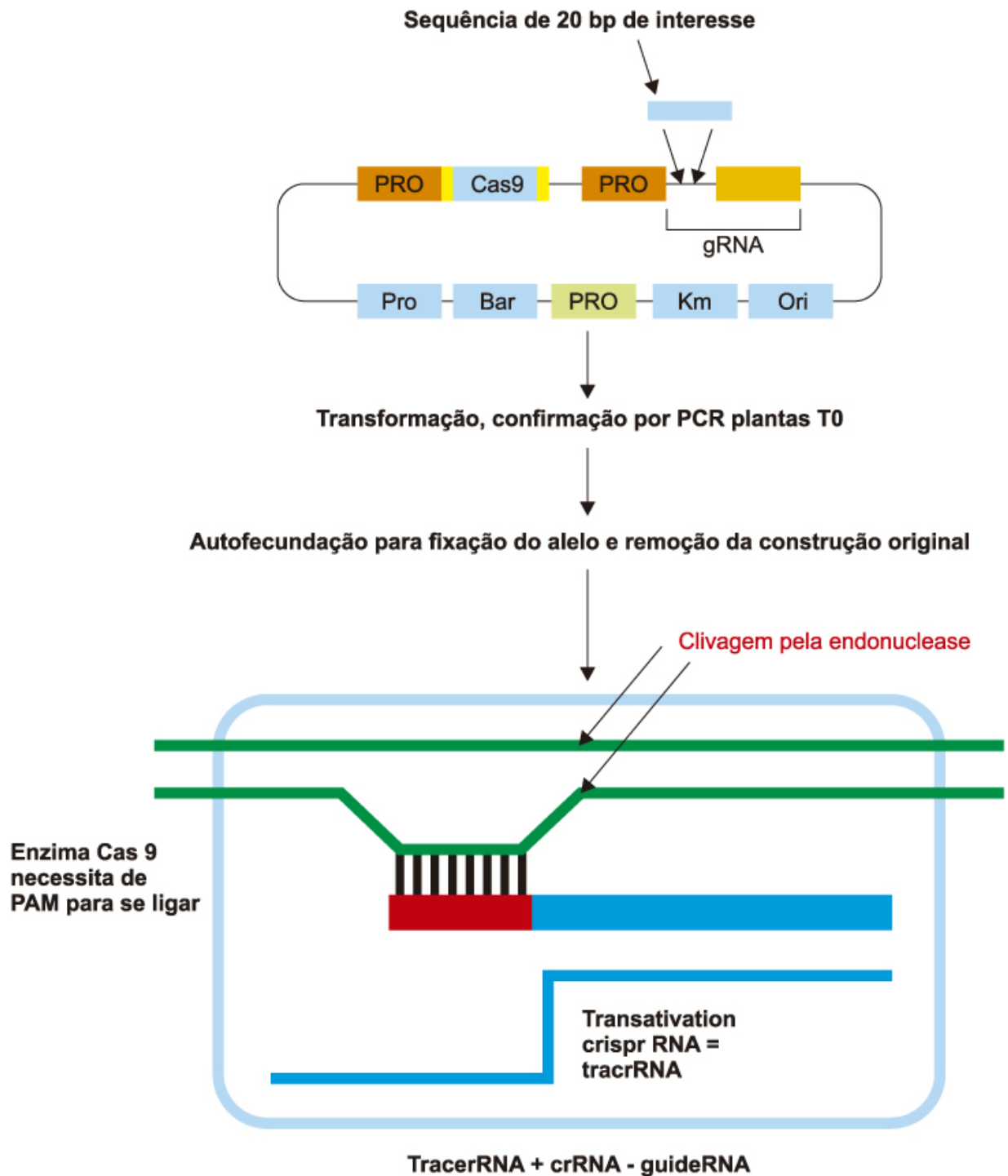


Figura 4. Esquema simplificado do funcionamento da edição de genomas via tecnologia CRISPR. Construção gênica que será inserida na planta contendo um gene isolado de um

vírus ou mollicute, e o modo de ação do complexo endonuclease Cas9 e o gRNA.

Ilustração: Newton Portilho Carneiro.

O processo que tem se mostrado mais eficiente para a inserção de construções gênicas, baseadas na tecnologia CRISPR em plantas, é a transformação genética via biobalística. A razão disso, provavelmente, se deve ao aumento da chance de ocorrer troca de alelos homólogos quando a região-alvo (gene da planta) está em menor número do que a construção gênica inserida.

Tecnicamente o uso da tecnologia CRISPR para o controle de vírus de RNA não é possível, pois as atuais nucleases, como a CAS9, reconhecem sequências de DNA e não de RNA. Recentemente, Abudayyeh et al. (2016) publicaram uma pesquisa mostrando que existem endonucleases capazes de reconhecer e clivar moléculas de RNA. Essa nuclease chamada de C2c2 foi isolada da bactéria *Leptotrichia shahii* e está relacionada com interferência contra fagos de RNA. Análises bioquímicas in vitro mostram que essa endonuclease é guiada por uma molécula simples de crRNA e pode ser programada para clivar moléculas de RNA fita simples criando dessa forma aplicabilidade da tecnologia de edição de genoma CRISPR para o controle de vírus de RNA. O conhecimento de sequências do genoma desses organismos permitirá a utilização de mais de um gene-alvo, aumentando assim a eficiência e a durabilidade da tecnologia.

Conclusões

Nas décadas de 1960 e 1970, o mundo presenciou um grande aumento da produtividade agrícola baseado em técnicas convencionais de melhoramento genético e uso intensivo de insumos agrícolas, mecanização e redução do custo de produção. Na década de 1990, um novo avanço na produção agrícola foi conseguido, a biotecnologia foi incorporada à agricultura com a comercialização das primeiras plantas geneticamente modificadas. Atualmente, com o advento de técnicas como o RNAi e o CRISPR, espera-se obter soluções finalísticas para vários estresses biótico e abióticos que afligem os campos. Semelhante ao que ocorreu com a transformação genética e a produção de OGMs, as modernas técnicas de RNAi e edição de genoma (CRISPR) também estão suscitando questões regulatórias, e uma resposta dos reguladores à aplicação destas novas técnicas é urgente para evitar possíveis riscos destas tecnologias, e ao mesmo tempo estimular a inovação, o desenvolvimento econômico e a confiança do consumidor.

Referências

ABUDAYYEH, O. O.; GOOTENBERG, J. S.; KONERMANN, S.; JOUNG, J.; SLAYMAKER, I. M.; COX, D. B.; SHMAKOV, S.; MAKAROVA, K. S.; SEMENOVA, E.; MINAKHIN, L.; SEVERINOV, K.; REGEV, A.; LANDER, E. S.; KOONIN, E. V.; ZHANG, F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. **Science**, v. 353, n. 6299, Aug. 2016.

AGRAWAL, N.; DASARADHI, P. V.; MOHMMED, A.; MALHOTRA, P.; BHATNAGAR, R. K.; MUKHERJEE, S. K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 657-685, 2003.

AN, G.; MITRA, A.; HONG, K. C.; COSTA, M. A.; NA, K.; THORNBURG, R. W.; RYAN, C. A. Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. **Plant Cell**, v. 1, p. 115-122, 1989.

BARCELO, P.; HAGEL, C.; BECKER, D.; MARTIN, A.; LORZ, H. Transgenic cereal (*Triticum*) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of

inflorescence tissue. **Plant Journal**, v. 5, n. 4, p. 583-592, 1994.

BARROS, G. S. C.; ALVES, L. R. A. Maior eficiência econômica e técnica depende do suporte das políticas públicas. **Visão Agrícola**, ano 9, n. 14, p. 4-7, 2015.

BAUM, J. A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, 2007.

BECKER, D.; BRETTSCHEIDER, R.; LORZ, H Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. **Plant Journal**, v. 5, n. 2, p. 299-307, 1994.

BECLIN, C.; BERTHOMÉ, R.; PALAUQUI J. C.; TEPFER, M.; VAUCHERET, H. Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. **Virology**, v. 252, n. 2, p. 313-317, 1998.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363-366, 2001.

BORTESI, L.; FISCHER, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. **Plant Journal**, v. 79, n. 2, p. 348-359, 2014.

BRIGNETI, G.; VOINET, O.; LI, W. X.; JI, L. H.; DING, S. W.; BAULCOMBE, D. C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **EMBO Journal**, v. 17, n. 22, p. 6739-6746, 1998.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

BUCHER, E.; SIJEN, T.; DE HAAN, P.; GOLDBACH, R.; PRINS, M. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. **Journal of Virology**, v. 77, n. 2, p. 1329-1336, 2003.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004.44 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 32).

CHRISTENSEN, A. H.; QUAIL, P. H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenic Research**, v. 5, p. 213-218, 1996.

CHRISTOU, P. C. S. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. **Euphytica**, v. 85, n. 1/3, p. 13-27, 1995.

DASGUPTA, I.; MALATHI, V. G.; MUKHERJEE, S. K. Genetic engineering for virus resistance. **Current Science**, v. 84, n. 3, p. 341-354, 2003.

DE BLOCK, M.; DE BROWER, D.; TENNING, P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 91, p. 694-701, 1989.

DEPICKER, A.; STACHEL, S.; DHAESE, P.; ZAMBRYSHI, P.; GOODMAN, H. M. Nopaline synthase, transcript mapping and DNA sequence. **Journal of Molecular and Applied Genetics**, v. 1, n. 6, p. 561-573, 1982.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 744-745, 1998.

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology**, v. 129, p. 13-22, 2002.

GAN, D.; ZHANG, J.; JIANG, H.; JIANG, T.; ZHU, S.; CHENG, B. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 11, p. 1261-1268, 2010.

GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ADAMS, T. R.; DAINES, R. J.; START, W. G.; O'BRIEN, J. V.; CHAMBERS, S. A.; ADAMS JR., W. R.; WILLETTS, N. G.; RICHE, T. B.; MACKEY, C. J.; KRUEGER, R. W.; KAUSCH, A. P.; LEMAUX, P. G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell**, v. 2, p. 603-618, 1990.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, p. 611-620, 1995.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 3, p. 227-235, 2010.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS. **Pocket K No. 34**: RNAi for crop improvement. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/34/>>. Acesso em: 13 set. 2016.

ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium*. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 745-750, 1996.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1614-1621, 2007.

KENNERDELL, J. R.; CARTHEW, R. W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. **Cell**, v. 95, p. 1017-1026, 1998.

KLEIN, T. M.; ARENTZEN, R.; LEWIS, P.; FITZPATRICK-MLLIGOT, S. Transformation of microbes, plants, and animals by particle bombardment. **Bio/Technology**, v. 10, n. 3, p. 286-291, 1992.

LESSARD, P. A.; KULAVEERASINGAM, H.; YORK, G. M.; STRONG, A.; SINSKEY, A. J. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. **Metabolic Engineering**, v. 4, p. 67-79, 2002.

LLAVE, C.; KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 24, p. 13401-13406, 2000.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

NGO, H.; TSCHUDI, C.; GULL, K.; ULLU, E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 14687-14692, 1998.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N.-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v. 313, p. 810-812, 1985.

OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; JUNG, H. Y.; WEI, W.; SUZUKI, S.; ARASHIDA, R.; NAKATA, D.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; NAMBA, S. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. **Nature Genetics**, v. 36, n. 1, p. 27-29, 2004.

PANDIT, N. N.; RUSSO, V. E. A. Reversible inactivation of a foreign gene, *hph*, during the asexual cycle in *Neurospora crassa* transformants. **Molecular and General Genetics**, v. 234, p. 412-422, 1992.

ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 3343-3353, 1992.

SANFORD, J.; KLEIN, T.; WOLF, E.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. **Journal Particulate Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 27-37, 1987.

SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSEL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: WU, R. (Ed.). **Recombinant DNA - Part H**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 483-510. (Methods in enzymology, 217).

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Cambridge: CAB International, 1994. 516 p.

SOLOGUREN, L. Demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir produção. **Visão Agrícola**, ano 9, n. 14, p. 8-11, 2015.

STRAZZI, S. Derivados do milho são usados em mais de 150 diferentes produtos industriais. **Visão Agrícola**, ano 9, n. 14, p. 146-150, 2015.

TERENIUS, O.; PAPANICOLAOU, A.; GARBUTT, J. S. et al. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 2, p. 231-245, 2011.

TIMMONS, L.; COURT, D. L.; FIRE A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, n. 1/2, p. 103-112, 2001.

VEGA, J. M.; YU, W.; KENNON, A.; CHEN, X.; ZHANG, Z. J. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 297-305, 2008.

VOINNET, O.; PINTO, Y. M.; BAULCOMBE, D. C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 24, p. 14147-14152, 1999.

WAQUIL, J. M.; OLIVEIRA, E.; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; CORREIA, L. A. Efeito na produção e incidência de viroses em híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 460-463, 1996.

WEI, Q.; LIPARDI, C.; PATERSON, B. M. Analysis of the 3'(-)-hydroxyl group in *Drosophila* siRNA function. **Methods**, v. 30, n. 4, p. 337-347, 2003.

ZHAO, Z. Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; HONDRED, D.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M.; PIERCE, D. High through put genetic transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Breeding**, v. 8, p. 323-333, 2001.