Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Sobrevivência do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e de seu vetor *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) em algumas espécies forrageiras

Felipe Franco de Oliveira

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

Piracicaba
2019

Felipe Franco de Oliveira
Engenheiro Agrônomo

Sobrevivência do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e de seu vetor *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) em algumas espécies forrageiras

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2019

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

Oliveira, Felipe Franco de

Sobrevivência do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e de seu vetor *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) em algumas espécies forrageiras/ Felipe Franco de Oliveira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.- - Piracicaba, 2019.

40 p.

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

1. Milho 2. Forrageiras 3. Cigarrinha do milho 4. Enfezamento vermelho I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico
A Vanessa Takeshita, esposa, amiga e confidente

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP e ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia por conceder a oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Ao Prof.° Dr.° Ivan Paulo Bedendo, pela orientação durante o período do mestrado, não somente a nível profissional, mas como exemplo de pessoa e ser humano, pela paciência e confiança, agradeço.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pelos conhecimentos adquiridos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pelo auxílio técnico fornecido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos durante todo o período do mestrado.

Ao Laboratório de Insetos Vetores, coordenado pelo Prof.° Dr.° João Roberto Spotti Lopes pelo fornecimento dos insetos e dos isolados de fitoplasma utilizados neste trabalho, em especial a Camila Haddad pelo auxílio no manuseio dos insetos.

Aos integrantes do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, Cláudia Alves de Almeida, Jacson Ferreira e Sarah Rodrigues Galvão pelo auxílio e ensinamentos constantes durante minha estadia no laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Arnaldo E. Fariña, Daiana Bampi, David A. M. Spadotti, Gabriel M. Favara, Heron D. Kraide, Talita N. Z. Silva, Tatiana Mituti, e Viviana M. C. Garcia pelo companheirismo e pelos auxílios prestados.

Aos meus amigos Alessandro S. da Silva, Fabiano B. Matos, Gabriel M. Favara, Luiz F. C. Ribeiro, Marizane Pietroski, Pablo Eduardo Gotardo e Vagner O. da Silva por tão agradavelmente fazerem parte desta jornada.

A minha mãe Paula Regina Franco de Oliveira, meu pai Luiz Carlos de Oliveira e meu irmão Guilherme Franco de Oliveira por compartilhar esse sonho comigo.

A minha esposa, Vanessa Takeshita pelo apoio, paciência e companheirismo incondicional, pois nada vem de graça, não é?

Try not. Do... or do not. There is no try.
~Yoda

SUMÁRIO

RESUMO **7**

ABSTRACT **8**

1. INTRODUÇÃO **9**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **11**

2.1. CULTURA DO MILHO 11

2.2 FITOPLASMAS 12

2.3 ENFEZAMENTO VERMELHO DO MILHO 12

2.4 DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE FITOPLASMAS 14

3. MATERIAL E MÉTODOS **16**

3.1 OBTENÇÃO DAS PLANTAS 16

3.2 OBTENÇÃO DO INÓCULO E CIGARRINHAS 16

3.3 TRANSMISSÃO DE FITOPLASMA DE PLANTAS DE MILHO PARA PLANTAS FORRAGEIRAS 17

3.4 PERSISTÊNCIA DE FITOPLASMA NOS TECIDOS DO HOSPEDEIRO 17

3.5 SOBREVIVÊNCIA DA CIGARRINHA NAS PLANTAS FORRAGEIRAS 18

3.6 Potencial das plantas forrageiras como fonte de inóculo do patógeno para o milho 18

3.7 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE MILHO E FORRAGEIRAS PARA USO EM PCR . 20

3.8 DETECÇÃO DO FITOPLASMA POR PCR 21

3.9 IDENTIFICAÇÃO DO FITOPLASMA POR PCR 22

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **23**

4.1 TRANSMISSÃO DO FITOPLASMA DE PLANTAS DE MILHO PARA PLANTAS FORRAGEIRAS E SUA PERSISTÊNCIA NOS TECIDOS DO HOSPEDEIRO 23

4.2 SOBREVIVÊNCIA DA CIGARRINHA NAS PLANTAS FORRAGEIRAS 26

4.3 POTENCIAL DAS PLANTAS FORRAGEIRAS COMO FONTE DE INÓCULO DO PATÓGENO PARA O MILHO 29

5. CONCLUSÕES **34**

REFERÊNCIAS **35**

RESUMO

Sobrevivência do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e de seu vetor *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) em algumas espécies forrageiras

A doença conhecida como enfezamento vermelho, associada a um fitoplasma do grupo 16SrI, subgrupo B, foi relatada em áreas brasileiras cultivadas com milho ainda no início da década de setenta. A importância econômica da doença se expressou a partir da década seguinte, com a introdução dos plantios de safrinha. O patossistema tem sido muito explorado em termos de pesquisa, porém falhas no conhecimento ainda são significativas. No presente trabalho foi investigada a sobrevivência do fitoplasma e da sua cigarrinha vetora *Dalbulus maidis* em algumas espécies forrageiras de alto interesse agronômico. Para isto, foram utilizadas cinco variedades de capim *Panicum maximum* cv. Mombaça, *P. maximum* x *P. infestum* cv. Massai, *Brachiaria bizantha* cv Marandu, *B. brizantha* cv. Piatã e *B. decumbens* cv. Basilisk (popularmente conhecida por Decumbens), os quais foram inoculados com o fitoplasma por meio de insetos infectivos alimentados em plantas de milho comprovadamente portadoras do patógeno. As avaliações foram realizadas tomando-se como critérios a detecção do fitoplasma nos tecidos dos capins, usando a técnica molecular de PCR, e a contagem diária do número de cigarrinhas mortas encontradas nas plantas forrageiras inoculadas. Amostragens de tecidos para a detecção do patógeno foram feitas aos 28, 56, 84, 112 e 140 dias após a inoculação, sendo as plantas cortadas para posterior rebrota, após cada amostragem. Também foi conduzido um ensaio em que cigarrinhas foram alimentadas em todas as variedades de forrageiras, portadoras do fitoplasma e, em seguida, confinadas em plantas sadias de milho. Os resultados revelaram que o fitoplasma estava presente em todas as plantas das diferentes variedades de capim, aos 28 dias após a inoculação. Aos 56 dias após a inoculação, o fitoplasma foi detectado em 66% das plantas de Marandu, 50% das plantas de Massai e 16% das plantas de Decumbens, Mombaça e Piatã. Aos 84, 112 e 140 dias após a inoculação, o patógeno não foi mais detectado nos tecidos rebrotados das plantas amostradas. Quanto à sobrevivência da cigarrinha, os capins se comportaram similarmente, dentro de cada um dos períodos de avaliação correspondentes a 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o confinamento dos insetos nas plantas; no período de 120 horas, praticamente todos os insetos estavam mortos. Em relação à infecção de plantas de milho por insetos alimentados em plantas forrageiras portadoras do patógeno, os dados evidenciaram ausência do fitoplasma em todas as plantas de milho inoculadas. Estes resultados evidenciaram que, em condições naturais, provavelmente, as forrageiras podem servir como reservatórios; no entanto, sugerem que estas forrageiras podem não atuar como fonte de inóculo do patógeno para plantas de milho. Ainda, os dados apontaram que nenhuma das variedades testadas se destacou como sendo mais favorável à sobrevivência do vetor.

Palavras-chave: *Zea mays*; Capins; Cigarrinha do milho; Mollicutes; Cicadellidae, Hospedeiros alternativos

ABSTRACT

Survival of the maize bushy stunt phytoplasma and its vector *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) in some forage species

Maize bushy stunt, associated with a phytoplasma of the group 16SrI, subgroup B, has been reported in Brazilian areas cultivated with corn since 1970s.The economic importance of the disease was expressed from 1980s, with the introduction of a cultivation system named “safrinha” maize. The pathosystem has long been explored, but failures of knowledge are yet significant. In the present work it was investigated the survival of the fitoplasma and its vector, the leafhopper *Dalbulus maidis*, in various forage species of high agronomic interest. So, five varieties of forage (*Panicum maximum* cv. Mombaça, *P. maximum* x *P. infestum* cv. Massai, *Brachiaria bizantha* cv Marandu, *B. brizantha* cv. Piatã e *B. decumbens* cv. Basilisk (popularly known by Decumbens) were used, which were inoculated with the phytoplasma via infective insects fed in corn plants infected by the pathogen. Assessment was conducted based on the detection of phytoplasma using PCR tecnique and daily counting of dead leafhoppers found in the inoculated forage plants. Tissues were collected for detection 28, 56, 84, 112 and 140 days after inoculation and plants were cut immediately after each sampling. In addition, an assay was conducted, in which insects were fed in infected plants belonging to all forage varieties and, subsequently, confined in healthy corn plants. The results allowed to detect the phytoplasma in all distinct forage varieties, 28 days after inoculation. Assesment made to the 56 days allowed to detect the pathogen in 66% of the plants of Marandu, in 50% of Massai, and 16% of plants of the varieties Decumbens, Mombaça and Piatã. In evaluations conducted to the 84, 112, and 140 days after inoculation, the phytoplasma was not more detected in the new tissues from forage plants. Concerning survival of leafhoppers, the different forage showed the same behavior, within each period corresponding to 24, 48, 72, 96 e 120 hours after confining of the insects in the plants; in the period of 120 hours, almost all insects were dead. In relation to the infection of corn plants by insects fed in forage plants infected with the pathogen, the analysis showed absence of the phytoplasma in all inoculated corn plants. These results pointed that, in natural conditions, probably the forages to serve as reservoir; however, they also suggested that these forages probably do not act as inoculum sources of the pathogen for corn plants. In addition, the results also demonstrated that none variety stood out as more favorable to survival of the leafhopper.

Keywords: *Zea mays*; Forage; Corn Leafhopper; Mollicutes; Cicadellidae; Alternative hosts

1. INTRODUÇÃO

O milho é considerado uma das culturas mais importantes do mundo, com uma produção estimada de 968 milhões de toneladas no ano de 2016 (USDA, 2017). Os grãos têm sido empregados como matéria-prima para diversos fins, entre eles a produção de açúcar, etanol, óleo e rações, consumidos para a alimentação humana e animal (Xue et al., 2013). Além disto, o milho é um produto primário com expressivo valor comercial no mercado internacional (Borém et al., 2015).

A produção brasileira de milho no ano de 2017 foi de 91,468 milhões de toneladas, em 17,07 milhões de hectares cultivados, sendo destes 11,52 milhões dedicados ao cultivo de segunda safra (Conab, 2017). Apesar da alta produtividade, vários fatores interferem negativamente na produção desta cultura, com destaque para as doenças, as quais são responsáveis por significativas reduções na produção de grãos. Assim, doenças se constituem em um dos fatores de produção mais importantes dentro deste agroecossistema. Dentre as principais doenças incidentes na cultura, tem sido relatada aquela conhecida por enfezamento vermelho, causada por um fitoplasma, a qual tem mostrado altas incidências, com ocorrências que variam de 65 - 100% de plantas sintomáticas em áreas de milho de sequeiro (Oliveira et al., 1998).

A doença se expressa pela presença de clorose dos bordos da folha, seguida de avermelhamento dos ápices e áreas marginais das folhas mais velhas; as espigas são de tamanho reduzido; brotações podem aparecer nas axilas foliares; plantas doentes podem mostrar redução no porte, afinamento do colmo e encurtamento de entrenós (Schurtleff, 1986). O agente causal é um fitoplasma, o qual foi inicialmente reportado no Brasil na década de setenta (Costa et al., 1971). Por meio de técnicas moleculares, o fitoplasma foi classificado como um representante do grupo 16SrI, mais especificamente pertencente ao subgrupo 16SrI-B (Gundersen et al., 1996). O fitoplasma do enfezamento vermelho também foi molecularmente identificado no Brasil como um membro do subgrupo 16SrI-B (Bedendo et al., 2000). A transmissão natural do patógeno é feita por um inseto sugador conhecido como cigarrinha do milho, pertencente à espécie *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae).

As medidas de controle da doença são dificultadas devido à pouca viabilidade da aplicação de tratamentos com produtos químicos contra o vetor (Toffanelli, 2001;

Oliveira et al., 2007), além da alta incidência da doença e suscetibilidade da maioria dos híbridos comerciais de milho (Silva et al., 2003). A redução da população do inseto pode ser aplicada pela quebra dos ciclos de plantio milho/milho, pois, o controle químico do vetor ainda não é bem esclarecido quanto a sua eficácia (Oliveira et al., 2007). Uma vez que o fitoplasma é um patógeno biotrófico, necessitando, portanto, de um hospedeiro vivo para sua sobrevivência, a prática cultural de erradicação de plantas espontâneas é recomendável, pois elimina possíveis reservatórios e fontes de inóculo que possam sobreviver entre estações de cultivo (Rao et al., 2017).

Além de plantas voluntárias, os hospedeiros alternativos desempenham papel importante na epidemiologia de doenças. Considerando-se o patossistema milho-fitoplasma, foram relatados um reduzido número de espécies como hospedeiras, tanto para o agente causal do enfezamento como para o inseto vetor (Ebbert & Nault, 2001).

No Brasil, existem evidências de que algumas espécies de gramíneas podem atuar como hospedeiras alternativas para o fitoplasma, dentre elas *Brachiaria plantaginea* (Bedendo et al., 2004), *B. decumbens e Panicum maximum* (Haas, 2005) e as a cigarrinhas tem sido relatada em algumas espécies de gramíneas, como alfafa, triticale, *Paspalum* sp. (Summers et al., 2004) e capim colonião (Haas, 2005). No entanto, o papel destas gramíneas ainda é pouco conhecido. A partir desta premissa, este estudo buscou avaliar cultivares comerciais de capim, que por sua vez são amplamente utilizadas em território nacional, quanto ao seu papel como hospedeiras do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho, visando expandir o entendimento do papel epidemiológico das mesmas para o fitoplasma e a cigarrinha do milho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura do milho

O milho é referido como a espécie alimentícia mais cultivada no mundo, usado em larga escala na alimentação humana e animal. É utilizado como matéria-prima básica em inúmeros produtos industrializados, desempenhando um papel socioeconômico importante na cadeia produtiva (Embrapa, 2012).

Botanicamente, o milho está inserido na família Poaceae, subfamília Panicoidae, gênero Zea, espécie *Zea mays* L. A planta é uma gramínea tropical, pertencente ao grupo C4, adaptada à alta intensidade luminosa e altamente produtiva, com alto gasto energético (Magalhães et al., 2002). O seu cultivo ocorre principalmente em regiões situadas entre 58° de latitude Norte (Canadá) e 40° de latitude Sul (Argentina), submetido a diversas altitudes, desde abaixo do nível do mar até regiões com altitude de 2500m. As condições ideais para o desenvolvimento da cultura implicam em temperatura do solo superior a 10°C e umidade próxima da capacidade de campo na época de semeadura; durante as fases de desenvolvimento vegetativo, floração e enchimento de grãos requer temperaturas em torno de 25°C, boa disponibilidade de água no solo, abundância de luz e umidade do ar superior a 70%; por ocasião da colheita exige períodos secos (Dourado Neto & Fancelli, 2004).

No Brasil, em regiões de produção intensiva, o cultivo do milho tem sido realizado em dois períodos, denominados de plantio tradicional (primeira safra) e plantio de safrinha (segunda safra ou milho de sequeiro) (Borém et al., 2015). No cultivo de primeira safra, a cultura é implantada nos meses de outubro a novembro, um período em que fica menos exposta a riscos climáticos como geada e seca. Já o milho cultivado na época de segunda safra, compreendendo o período de janeiro a abril, está fora da época ideal de plantio, não dispondo, portanto, das melhores condições climáticas para o seu desenvolvimento.

A produção do milho no Brasil registrou nas últimas três décadas um significativo aumento de 3,62% ao ano, estando previsto crescer 1,25% ao ano para os próximos 10 anos (Conab, 2017). Esse incremento na produtividade de grãos se deve principalmente ao melhoramento genético e ao melhor manejo da cultura (Haegele et al., 2013). Essa taxa de crescimento poderia ser maior, porém, as interferências abióticas e bióticas sofridas pela cultura são constantes, sendo

inseridas nesse contexto a ocorrência de doenças, responsáveis por causarem grandes danos à cultura e, consequentemente, significativas perdas aos produtores.

2.2 Fitoplasmas

Fitoplasmas são procariotos fitopatogênicos, sem parede celular, apresentando uma única membrana envolvendo o citoplasma, pleomórficos, pertencentes à classe Mollicutes, reproduzindo-se por gemulação ou fissão binária transversa (Lee et al., 2000). São microrganismos parasitas obrigatórios encontrados no floema de plantas e na hemolinfa de insetos, causadores de doenças identificadas por variados tipos de sintomas que podem ocorrer isoladamente ou, mais frequentemente, em conjunto, dependendo do hospedeiro e do patógeno (Bedendo, 2011). Os sintomas são induzidos por alterações no equilíbrio hormonal, no processo de fotossíntese e no transporte de fotossintetizados e se expressam, entre outros, por clorose foliar, nanismo, enrolamento de folhas, esterilidade de flores, avermelhamento de folhas, proliferação de gemas, declínio, filodia e virescência (Gutiérrez & Almaraz, 2008).

Em condições naturais, os fitoplasmas são transmitidos por insetos vetores pertencentes à ordem Hemiptera, família Cicadellidae, Cixidae e Psylidae (Gutiérrez & Almaraz, 2008). As cigarrinhas são os mais importantes vetores de fitoplasmas, contudo psilídios também podem transmitir esses patógenos. Além de insetos vetores, os fitoplasmas poder ser transmitidos por enxertia de tecidos vegetais e por órgãos de propagação vegetativa, porém não são transmitidos mecanicamente através da seiva proveniente de planta infectada (Lee et al., 2000).

As estratégias para controle de doenças causadas por fitoplasmas compreendem a erradicação de plantas doentes, visando diminuir o inóculo na área cultivada; a produção e utilização de mudas sadias, não portadoras do patógeno; a aplicação de inseticidas para o controle de insetos vetores; e a utilização de material resistente ou tolerante, quando disponível no mercado (Garnier et al., 2001).

2.3 Enfezamento vermelho do milho

Historicamente, o enfezamento vermelho foi relatado pela primeira vez em 1945 nos Estados Unidos, no estado do Texas (Altstatt, 1945). Já em território brasileiro, o primeiro relato de enfezamento ocorreu no início da década de 70, sendo

nesta época considerada uma doença de importância secundária, sem amplos prejuízos à produção, porém com potencial para causar sérios danos à cultura (Costa et al., 1971). A doença, na época de sua descoberta, foi inicialmente atribuída aos vírus, sendo posteriormente demonstrada a sua associação com organismos do tipo fitoplasmas (Nault, 1980).

No Brasil, o enfezamento vermelho do milho passou a causar maior preocupação a partir da década de 80 com o aumento de plantios que adotavam o sistema de milho safrinha, sendo este o que mais favorece o aparecimento e desenvolvimento da doença, onde há maior incidência quando comparada à safra de verão do milho (Oliveira et al., 2002). Devido ao aumento dessa prática, mudaram-se as condições favoráveis à ocorrência do enfezamento, provavelmente, pelo fato do milho ser cultivado numa época em que as condições de alta umidade e temperatura favorecem o aumento da população da cigarrinha vetor (Massola Junior et al., 1999).

Alguns estudos demonstraram que a doença provoca significativas reduções na produção, atingindo níveis de até 30% em parcelas sob infestação natural em comparação com aquelas tratadas com inseticidas (Massola Júnior, 1998). Em outros casos, tem sido relatados índices de incidência de até 100%, levando à perda quase total da produção de campos comerciais localizados na região do Brasil-Central (Oliveira et al., 1998). Danos 52,5 a 72,5 % na produção foram encontradas em ensaios conduzidos em condições controladas, devido à redução no desenvolvimento das plantas, tamanho das espigas, número de grãos por planta, além de alta proporção de grãos miúdos (Toffanelli, 2001).

Os sintomas induzidos pelo fitoplasma do enfezamento vermelho em plantas de milho são geralmente observados em 30 dias após a inoculação, sendo estes caracterizados pela clorose dos bordos da folha, seguida de avermelhamento dos ápices e áreas marginais das folhas mais velhas (Nault, 1980). De forma geral, os sintomas exibidos por plantas infectadas pelo fitoplasma são variáveis de acordo com o híbrido ou variedade de milho (Bedendo, 1995). Proliferação de espigas anormais pode ocorrer em plantas enfezadas. Brotações do tipo perfilhos podem aparecer nas axilas das folhas e na base das plantas. Outros sintomas, como redução do porte da planta, afinamento do colmo e encurtamento de entrenós também podem ser observados (Schurtleff, 1986).

Em condições de campo, a transmissão do fitoplasma ocorre obrigatoriamente através da cigarrinha *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) que é descrita como a principal espécie vetora do fitoplasma (Nault, 1980). A característica desses insetos de se alimentarem no floema está diretamente relacionada com a aquisição desse patógeno, o qual é estritamente habitante do floema (Granados, 1969). A cigarrinha é uma espécie considerada monófaga que se hospeda em plantas pertencentes ao gênero *Zea* (milho e teosinto), habitando uma ampla variedade de locais com diferentes condições climáticas que podem estar localizados ao nível do mar até 3.200 m de altitude nos Andes peruanos (Nault, 1990). A cigarrinha *D. maidis* é descrita como vetor de três patógenos do milho: o espiroplasma *Spiroplasma kunkelii,* vírus do raiado fino de milho (MRFV) e fitoplasma do enfezamento vermelho de milho (MBSP) (Waquil et al. 1999, Özbeck et al. 2003, Ammar et al., 2011), sendo estas doenças economicamente importantes na América Latina.

A estratégia de sobrevivência de *D. maidis* ainda é pouco explorada, sendo escassos os trabalhos que buscam entender seu mecanismo de persistência em épocas de entressafra, quando o milho, seu principal hospedeiro, se encontra ausente nas lavouras. Ebbert & Nault (1994) sugerem que estratégias de migração e alimentações esporádicas, podem ter algum papel na sobrevivência da cigarrinha. Oliveira et al. (2013) sugere que a cigarrinha possua mecanismos mistos de sobrevivência na entressafra, os quais envolvem a colonização de plantas voluntárias ou de plantas cultivadas em lavouras irrigadas. No entanto, estes mesmos autores encontraram grande número de indivíduos em áreas de pastagens comerciais, distanciadas de áreas contendo plantas voluntárias de milho, plantas cultivadas de milho ou presença de ervas daninhas. Ainda, apesar da reconhecida associação íntima entre *D. maidis* e o milho, a cigarrinha tem sido relatada em algumas espécies de gramíneas, como alfafa, triticale, *Paspalum* sp. (Summers et al., 2004) e capim colonião (Haas, 2005). Estas plantas são sugeridas como abrigo temporário ou fonte de alimentação das cigarrinhas, evidenciando a possibilidade de gramíneas atuarem como hospedeiros intermediários que, de acordo com Summers et al. (2004), podem preservar a sobrevivência da cigarrinha entre as estações de cultivo do milho.

2.4 Detecção, identificação e classificação de fitoplasmas

A observação dos sintomas é a primeira etapa para a diagnose de doenças induzidas por fitoplasmas, porém deve ser complementada com a detecção deste

procarioto, demonstrando a associação constante entre a doença e o agente presente nos tecidos vegetais (Bedendo, 1995). Os fitoplasmas foram detectados inicialmente em tecidos vegetais pelo uso de microscopia eletrônica de transmissão. Com o desenvolvimento da biotecnologia, a detecção e a caracterização ou identificação desses patógenos passaram a ser conduzidas com o uso de técnicas moleculares. O emprego combinado de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e análise filogenética perfazem um sistema clássico e confiável para detecção, identificação e classificação desses agentes, baseado principalmente na análise de sequências do gene 16S rRNA (Davis, 1995; Harrison et al., 1996; Lee et al., 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das plantas

Os ensaios foram realizados em casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USP, Piracicaba-SP, no período entre junho de 2017 e março de 2018. Foram utilizadas sementes de plantas de milho do híbrido MG300, bem como sementes dos capins/forrageiras *Panicum maximum* cv. Mombaça, *P. maximum* x *P. infestum* cv. Massai, *Brachiaria bizantha* cv Marandu, *B. brizantha* cv. Piatã e *B. decumbens* cv. Basilisk (popularmente conhecida por Decumbens). As mudas foram preparadas em sementeiras de bandejas, com aproximadamente 1 litro do substrato comercial (Tropstrato HT Hortaliças®). O substrato tem em sua composição casca de pinus, turfa, vermiculita expandida, sendo enriquecido com macro e micronutrientes. As mudas foram transplantadas com aproximadamente 20cm de altura para vasos com capacidade de 3 litros, contendo como substrato uma mistura de ¼ de substrato comercial, ¼ de areia autoclavada e ½ de solo autoclavado. O substrato dos vasos foi fertilizado com a formulação N-P-K (10-10-10) no plantio e incorporado ao solo.

3.2 Obtenção do inóculo e cigarrinhas

O isolado do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e as cigarrinhas *D. maidis* utilizados nos ensaios foram gentilmente cedidos pelo Dr. João Roberto Spotti Lopes, professor do Departamento de Entomologia da ESALQ.

As plantas fontes de inóculo eram infectadas com o fitoplasma do isolado denominado R4, proveniente de área de cultivo de milho do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP. A identidade do isolado usado no ensaio foi revelada por meio de técnicas moleculares, confirmando a classificação do mesmo como um afiliado ao subgrupo 16SrI-B.

As colônias do inseto foram mantidas em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos (ESALQ) em gaiolas teladas de alumínio, com 60x30x30 cm, seguindo método semelhante ao descrito por Oliveira e Lopes (2004), dentro de estufa com temperatura variando entre 15 a 35°C. Os insetos *D. maidis* pertencentes a colônia não infectiva, eram provenientes da região rural de Jardinópolis-SP.

3.3 Transmissão de fitoplasma de plantas de milho para plantas forrageiras

A população infectiva do inseto foi obtida pela submissão de cigarrinhas à alimentação em plantas de milho comprovadamente portadoras de fitoplasma, visando à aquisição do agente patogênico pelo vetor. Todos os procedimentos foram realizados em casa-de-vegetação com temperatura controlada (25°C ± 5°C). O período de acesso à aquisição (PAA) do fitoplasma foi de quatro dias. Em seguida, os insetos foram transferidos para plantas sadias de milho, nas quais permaneceram por um período de 21 dias, correspondente ao período de latência (PL).

Uma vez obtida a população infectiva, 10 cigarrinhas foram confinadas em cada uma das seis plantas pertencentes a cada uma das cinco variedades de forrageiras. O confinamento foi realizado quando as plantas atingiram o estádio de três a quatro folhas. Os insetos permaneceram nas plantas durante cinco dias (120 horas), correspondentes ao período de acesso à inoculação (PAI). Após este período, as cigarrinhas foram eliminadas mecanicamente das plantas inoculadas. Para o confinamento, foram utilizadas gaiolas cilíndricas de acetato, com dimensões de 30x20cm, recobertas com tecido do tipo “voile” (Figura 1). O controle positivo foi representado por plantas de milho do híbrido MG300, as quais foram inoculadas com 10 indivíduos da população infectiva de cigarrinhas por planta. Quatro plantas de cada forrageira testada, não submetidas à inoculação, foram consideradas como controle negativo. Para atender o período do ciclo natural de crescimento das forrageiras e o período de intervalo entre pastejo, as avaliações foram feitas aos 28 dias após a inoculação, por meio da detecção do fitoplasma nos tecidos vegetais usando-se a técnica de duplo PCR e observação da presença de sintomas.

3.4 Persistência de fitoplasma nos tecidos do hospedeiro

A persistência de fitoplasma nas plantas forrageiras inoculadas foi avaliada pela detecção do patógeno por meio de PCR. Todas as plantas forrageiras inoculadas com o fitoplasma foram avaliadas aos 28, 56, 84, 112 e 140 dias após a inoculação. Após cada avaliação, todas as plantas foram cortadas na altura de 15 cm e mantidas para posterior rebrota. Assim, as plantas passaram por cortes sucessivos a cada 28 dias. Em cada avaliação foi coletado tecido da parte aérea, o qual foi posteriormente usado em duplo PCR, visando à detecção de fitoplasma. Plantas de milho inoculadas por insetos infectivos foram usadas como controles positivos, as quais foram destruídas

após cada época de amostragem. Aos 140 dias após a inoculação, o sistema radicular das plantas forrageiras foi amostrado e submetido ao teste de duplo PCR, visando a detecção do fitoplasma.

3.5 Sobrevivência da cigarrinha nas plantas forrageiras

Para a determinação da capacidade de sobrevivência da cigarrinha nas diferentes forrageiras, foram realizadas contagens diárias de insetos mortos nas plantas até o quinto dia após a inoculação, quando todos os insetos foram eliminados.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011) com base no teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

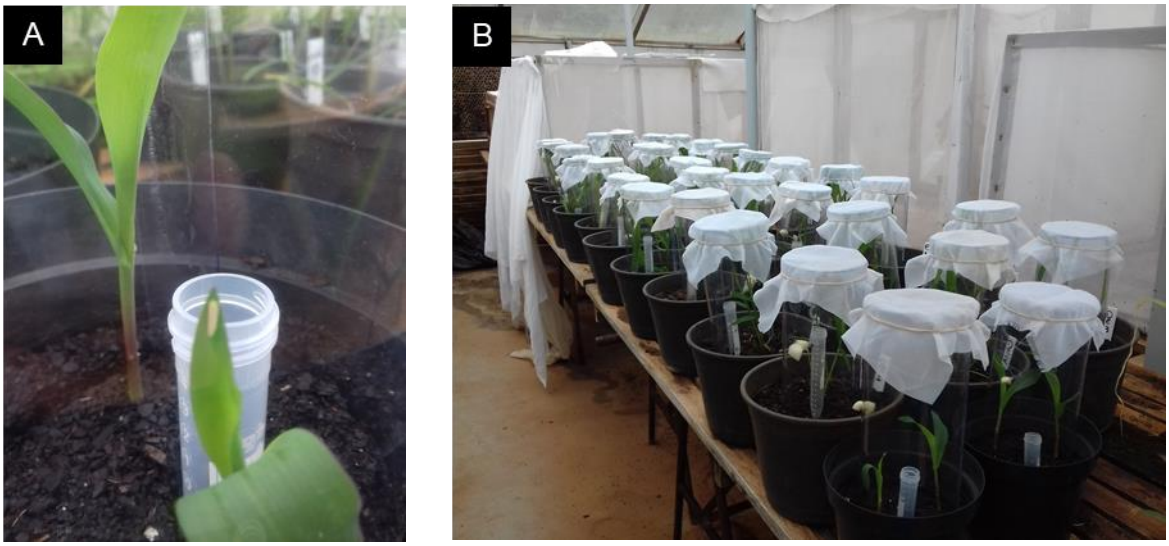

Figura 1: a) Detalhe do confinamento de cigarrinhas em plantas de milho, por meio de gaiola de acetato. B) Visão geral das plantas durante os testes de transmissão

3.6 Potencial das plantas forrageiras como fonte de inóculo do patógeno para o milho

Com o objetivo de avaliar o potencial destas forrageiras como fonte de inóculo do fitoplasma, 200 cigarrinhas não infectivas foram confinadas em uma planta de cada variedade de forrageira aos 58 DAI, previamente confirmadas como portadoras de fitoplasma. O número elevado de insetos confinados nas plantas forrageiras foi adotado levando-se em consideração os altos níveis de mortalidade observados neste mesmo trabalho. Os insetos permaneceram nas plantas forrageiras durante um período de acesso à aquisição (PAA) de quatro dias e, posteriormente, foram transferidos para plantas sadias de milho, no estádio de três a quatro folhas, onde

permaneceram por um período de latência de 21 dias. Após esta etapa, as cigarrinhas foram transferidas para novas plantas de milho, na proporção de 10 insetos/planta, em um ensaio com cinco repetições, onde cada planta inoculada representou uma repetição. O período de acesso à inoculação (PAI) foi de seis dias, ao final do qual as cigarrinhas foram eliminadas mecanicamente. A Figura 2 ilustra parte das etapas realizadas neste ensaio. As avaliações foram feitas pela análise de PCR das plantas de milho inoculadas e observação de sintomas, aos 45 dias após o confinamento dos insetos infectivos.

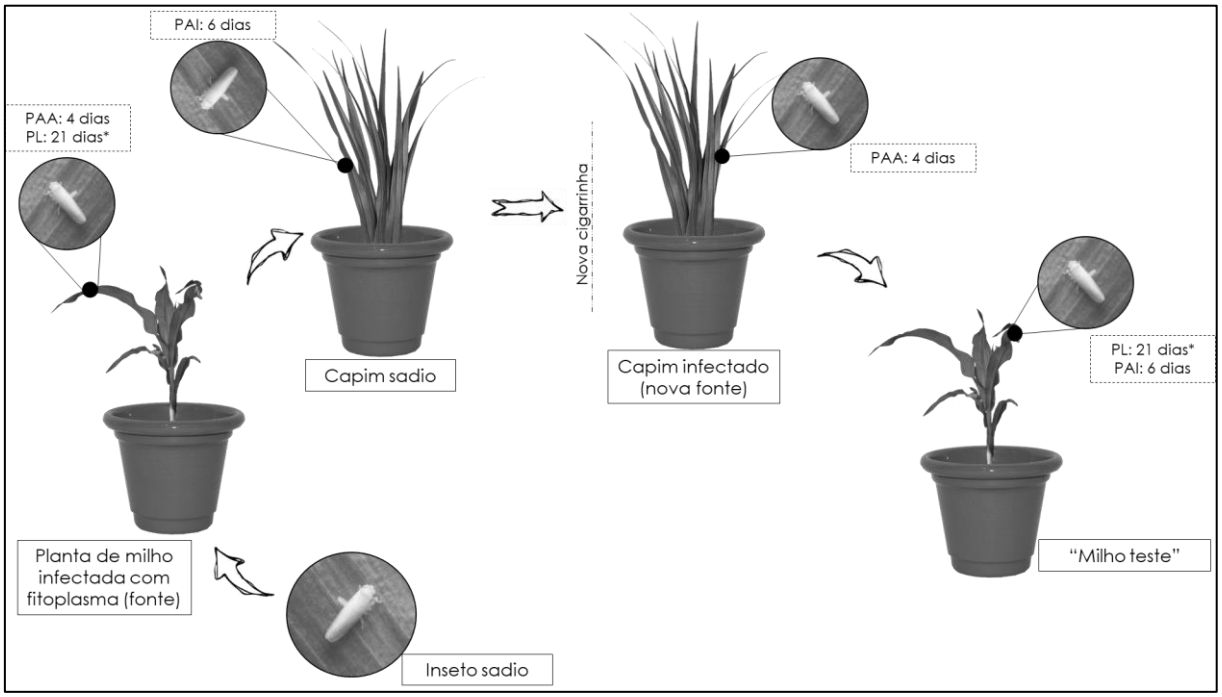

Figura 2: Representação esquemática da transmissão de fitoplasma de plantas de milho para plantas forrageiras, e tentativa de transmissão de plantas forrageiras para plantas de milho. Siglas: PAA: período de acesso à aquisição; PL: período de latência; PAI: período de acesso a inoculação.

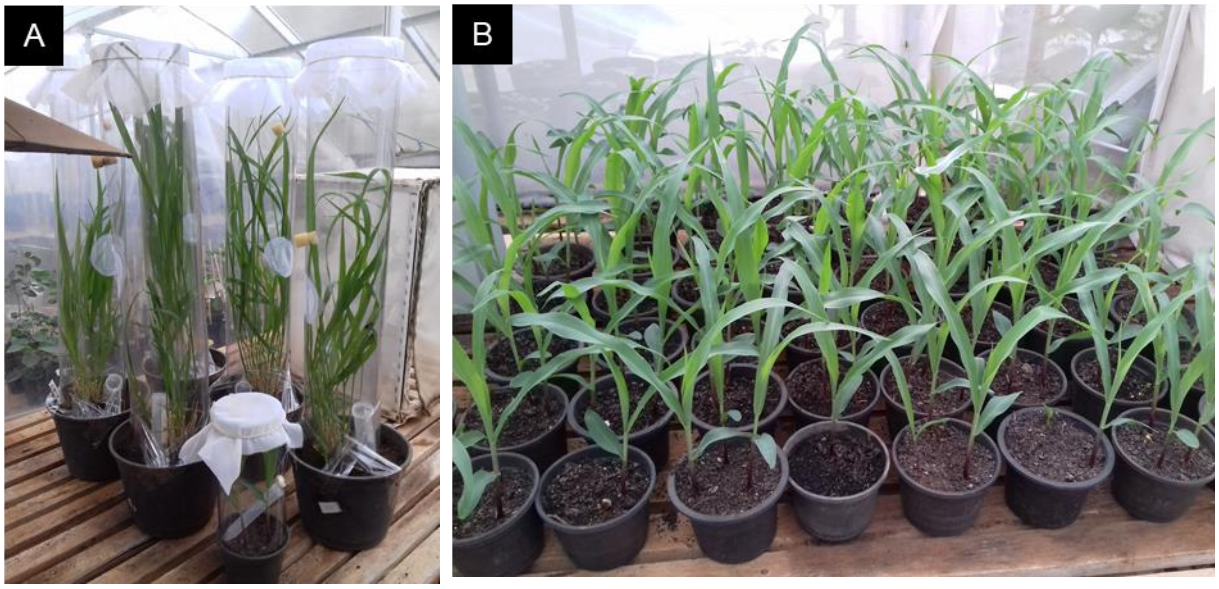

Figura 3: a) Plantas forrageiras tentativamente utilizadas como fonte de fitoplasma para plantas de milho. B) Visão geral das plantas de milho inoculadas com cigarrinhas alimentadas em forrageiras portadoras de fitoplasma.

3.7 Extração de DNA das amostras de milho e forrageiras para uso em PCR

Para a extração de DNA total das amostras foi utilizada a metodologia de Doyle & Doyle (1987). Para cada amostra, aproximadamente um grama de tecido vegetal composto por folhas e ramos novos ou por raízes foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. Posteriormente, o material macerado foi colocado em um tubo tipo “eppendorff” de 1,5 ml, adicionados 800 µL de tampão de extração 2x CTAB a 60°C aquecido em banho-maria. A solução do tampão de extração foi preparada com 10ml de água MiliQ, 2g de CTAB; 8,18g de NaCL; 0, 74g de EDTA; 1,57g de Tris - HCL; e 1,0g de PVP. O pH 8.0 foi ajustado ao final do processo. O extrato foi mantido em banho-maria a 65°C por 60 minutos, sendo agitado em vortex a cada dez minutos. Uma alíquota de 600 µL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1) foi adicionado, seguido de agitação por 1 minuto e centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi removido para novo tubo de 1,5 ml e recebeu 540µL de isopropanol a -20°C. Em seguida, o tubo foi agitado para precipitação dos ácidos nucléicos e foi mantido no congelador por 12 horas. Após esta etapa, foi realizada uma centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 1ml de etanol 80%. O tubo foi mantido à temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), por 10 minutos, para a remoção do álcool. Uma alíquota de

500 µL de cloreto de sódio (NaCl 1M) foi acrescentado ao precipitado e o material foi incubado por 30-60 minutos a 4°C. Em seguida, nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com álcool 80%. Após o descarte do etanol, o tubo foi mantido aberto e invertido sobre papel toalha, à temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), para secagem do precipitado. Após a secagem, o precipitado foi ressuspendido em 10 ml de água miliQ e o conteúdo armazenado a -20°C para ser utilizado nas reações de PCR.

3.8 Detecção do fitoplasma por PCR

As amostras foram analisadas pela técnica de duplo PCR, sendo que, na primeira reação foram utilizados o par de iniciadores (primers) R16 mF2 (5'cat gca agt cga acg a 3') /mR1 (5'ctt aac ccc aat cat cga c 3') (Gundersen & Lee, 1996). Na segunda reação foram empregados os iniciadores R16 F2n (5' gaa acg act gct aag act gg 3') /R2 (5' tga cgg gcg gtg tgt aca aac ccc g 3') (Gundersen & Lee, 1996). O DNA amplificado na primeira reação de PCR foi usado como molde para a segunda reação. O segundo par de iniciadores amplifica uma sequência nucleotídica de aproximadamente 1200 pb do DNA de fitoplasmas, correspondente à região do gene 16S rDNA. Como padrão positivo para as reações de PCR foi utilizado o DNA extraído de plantas de milho sabidamente infectadas, enquanto os padrões negativos foram representados pelo DNA de plantas sadias de milho e pela água.

As reações de PCR foram processadas em um volume final de 25 µL, contendo 24 µL de mistura de reação e 1 µL do extrato do DNA diluído ou puro. Os componentes da reação eram dispostos em 18,14 µL de água deionizada autoclavada (miliQ), 2,5 µL de solução tampão 10x PCR (Go Taq® Green Master Mix, Promega, USA), 2 µL de dNTP (na concentração de 200 µM para cada base), 0,6 µL de cada iniciador (na concentração de 20 pmol/µL) e 0,16 µL de Amplitaq 5 U/ µL. As programações do termociclador foram ajustadas de acordo com as recomendações sugeridas por Gundersen e Lee (1996) para os iniciadores utilizados, sendo estas, 35 ciclos que eram compreendidos pelas seguintes etapas: 1 minuto a 94 °C para desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos a 60 °C para hibridização dos iniciadores e 3 minutos a 72 °C para extensão da fita. Na reação com o par F2n/R2, foi utilizado um programa com 35 ciclos que compreende 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 2 minutos a 55 °C para hibridização e 3 minutos a 72 °C para extensão. Em ambos os casos, foi

permitida uma etapa inicial de desnaturação de 1 minuto a 94 °C e uma etapa final de extensão de 7 minutos a 72 °C. Os produtos obtidos na reação de PCR duplo, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo o corante Sybr safe® 1%, usando tampão TBE 0,5 X. No processo de eletroforese, o DNA gerado foi submetido à corrente elétrica por 60 minutos a 65 volts, sendo a visualização dos fragmentos amplificados realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

3.9 Identificação do fitoplasma por PCR

Após a detecção de fitoplasmas nas amostras, os produtos da primeira reação de PCR foram reamplificados com iniciadores específicos para fitoplasmas pertencentes ao grupo de classificação 16SrI. A identificação foi conduzida com o par de iniciadores R16 (I) F1 - 5’ taa aag acc tag caa tag g 3’ /R1 - 5’ caa tcc gaa ctg aga ctg t 3’ (Lee et al., 1994). O padrão positivo foi representado pelo DNA extraído de plantas de milho infectadas pelo fitoplasma associado ao enfezamento vermelho, pertencente ao grupo 16SrI.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transmissão do fitoplasma de plantas de milho para plantas forrageiras e sua persistência nos tecidos do hospedeiro

Os testes de amplificação do 16S rDNA permitiram a detecção do fitoplasma em todas as amostras de forrageiras. Apesar da detecção do patógeno, nenhuma das plantas infectadas exibiu algum tipo de sintoma que evidenciasse visivelmente a presença do patógeno nos seus tecidos.

As análises de duplo PCR mostraram que o fitoplasma foi transmitido para todas as variedades de capins. Todas as seis plantas de cada variedade foram positivas para a presença do patógeno. A transmissão foi comprovada pela detecção do fitoplasma nos tecidos das plantas submetidas às populações das cigarrinhas infectivas, amostradas aos 28 dias após a inoculação (Tabela 1). A detecção do patógeno foi revelada pela amplificação de fragmentos genômicos de 1.200 pb, típicos para fitoplasmas, quando os iniciadores R16 F2n/R2 são usados nas reações de PCR (Figura 4). As plantas de milho, utilizadas como padrões também revelaram resultados positivos para a presença do fitoplasma em seus tecidos. Contrariamente, o fitoplasma estava ausente dos tecidos provenientes das plantas usadas como controles negativos.

Após a primeira avaliação aos 28 dias, os capins foram cortados e mantidos para obtenção da rebrota. Aos 56 dias após a inoculação, novas amostras foram coletadas a partir do tecido proveniente da rebrota. Os resultados apontaram quatro plantas positivas para a variedade Marandu, três para o capim Massai e uma planta positiva para cada uma das demais variedades (Tabela 1). Os controles positivos e negativos repetiram os resultados da primeira avaliação. Em termos percentuais, nesta época de avaliação, o fitoplasma foi detectado em 66% das plantas de Marandu, 50% das plantas de Massai e 16% das plantas de Decumbens, Mombaça e Piatã.

Nas plantas amostradas aos 84, 112 e 140 dias após a inoculação, o fitoplasma não foi detectado, evidenciando sua ausência nos tecidos das plantas rebrotadas após o segundo corte da parte aérea, realizado aos 56 dias (Tabela 1). Resultados de duplo PCR conduzido com tecido radicular das plantas forrageiras também revelaram a ausência do fitoplasma. Ainda, o fitoplasma também não foi detectado nas plantas

representativas do controle negativo, porém as plantas de milho sempre se mostraram positivas para a presença do patógeno.

Tabela 1: Número de plantas forrageiras infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho do milho após rebrota aos 28, 56, 84, 112 e 140 dias após a inoculação do patógeno por meio do vetor *Dalbulus maidis*

Planta testada	**Nº de plantas infectadas/Nº de plantas inoculadas (% de infecção)**				
	28 Dias	**56 Dias**	**84 Dias**	**112 Dias**	**140 Dias**
B. brizantha cv. Marandu	6/6 (100)	4/6 (66,6)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)
P. maximum x *P. infestum* cv. Massai	6/6 (100)	3/6 (50,0)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)
B. brizantha cv. Piatã	6/6 (100)	1/6 (16,6)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)
P. maximum cv. Mombaça	6/6 (100)	1/6 (16,6)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)
B. Decumbens cv. Basilisk	6/6 (100)	1/6 (16,6)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)

Em trabalhos conduzidos no Brasil, a transmissão experimental do fitoplasma do milho para plantas de capim foi anteriormente relatada para espécies diferentes daquelas usadas no presente trabalho. Assim, por meio de população infectiva de *D. maidis*, o agente do enfezamento vermelho foi transmitido para os capins marmelada (*B. plantaginea*), colonião (*P. maximum*) e braquiária (*B. decumbens*) (Haas, 2005). Existem relatos da presença de um fitoplasma do grupo 16SrI, mesmo grupo de classificação do fitoplasma do milho, em plantas de capim marmelada naturalmente infectadas, encontradas em campo comercial de milho com alta incidência de enfezamento vermelho (Bedendo et al., 2004). Na Austrália, foram relatadas gramíneas das espécies *Cenchrus setiger*, *C. ciliares* e *Eragrostis falcata* como hospedeiras alternativas para o fitoplasma associado à folha branca da cana-de-açúcar (Tran-Nguyen et al., 2000). Também na Austrália, gramíneas como *Chloris inflata, Dactyloctenium aegyptium, D. radulans* e *Whiteochloa biciliata* foram reveladas como portadoras do fitoplasma da doença conhecida como ‘grassy shoot’ ocorrente em plantas de cana-de-açúcar (Blanche et al., 2003). Em relação ao patossistema trigo e o fitoplasma que ocorre em associação com o nanismo azul, o agente causal da doença foi encontrado em diversas gramíneas, tais como *Aegilops squarrosa*, *Avena fátua* e *Eragrostis cilianensis* (Wu et al., 2010).

Em relação à persistência do patógeno nos tecidos das variedades de forrageiras, a redução no número de plantas infectadas no decorrer do tempo

observada neste estudo, pode ser atribuída à dificuldade de colonização de novos tecidos por parte do fitoplasma, pois, as avaliações eram realizadas em tecidos novos derivados de rebrota, o que implicaria em um processo de realocação do fitoplasma de tecidos já colonizados para novos tecidos. Este ponto de discussão tem apoio no relato de Roddee et al. (2018), o qual justifica que essa dificuldade pode estar atrelada à necessidade de movimentação do patógeno no sentido contra fluxo do floema e aos possíveis mecanismos de defesa da planta. Estes fatores atuariam no sentido de retardar a multiplicação do fitoplasma, resultando em menores títulos ou concentrações do patógeno nos tecidos jovens. Roddee et al. (2017) demonstraram, em um trabalho realizado com o fitoplasma da folha branca da cana-de-açúcar, uma baixa concentração de células do fitoplasma em tecidos novos, mesmo aos nove meses após a inoculação. Esta baixa concentração foi atribuída à demora no movimento de realocação do patógeno na planta. A dificuldade do microrganismo em se deslocar nos tecidos jovens também foi considerada no trabalho de Lee et al. (2013), o qual revelou que o fitoplasma associado à vassoura de bruxa da jujuba (*Ziziphus jujuba*) pode demorar até 82 dias para ser detectado em todas as partes da planta, após o processo de inoculação via enxertia em plantas de vinca. Em ensaio com a espécie *Vicia faba*, Salar et al. (2012) observaram que em plantas inoculadas com o agente causal da flavescência dourada da videira por meio de inseto vetor, a concentração ou título bacteriano se estabilizou aos 30 dias após a inoculação, evidenciando, nesse caso, que o fitoplasma atingiu a fase estacionária de crescimento após este período.

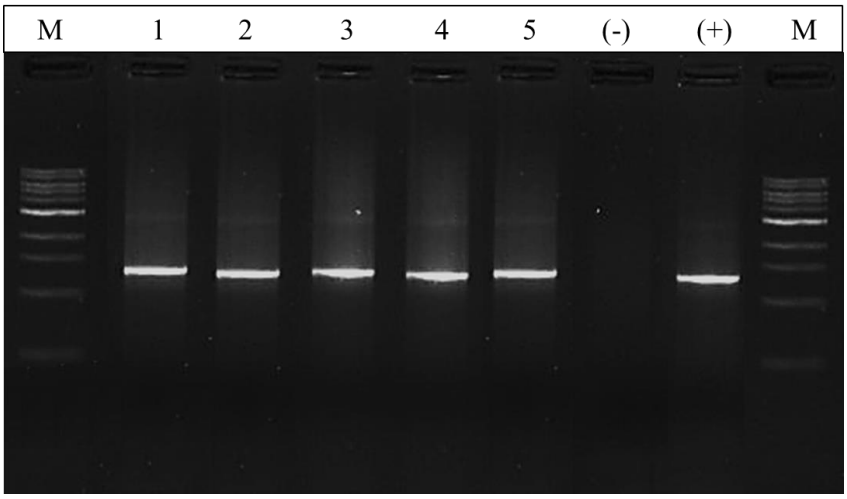

Figura 4: Detecção do fitoplasma do enfezamento do milho em amostras de forrageiras, através de duplo PCR, usando-se os iniciadores específicos para o grupo 16SrI. M= marcador molecular 1Kb ladder; 1= *P. maximum* cv. Mombaça, 2= *P. maximum* x *P. infestum* cv. Massai; 3= *B. bizantha* cv. Marandu; 4= *B. decumbens* cv. Basilisk; 5= *B. brizantha* cv. Piatã; (-)= milho sem contato com *D. maidis*; (+)= milho exposto a *D. maidis* infectiva.

4.2 Sobrevivência da cigarrinha nas plantas forrageiras

A cigarrinha apresentou comportamento similar quanto à sobrevivência nas diferentes variedades de forrageiras. Esta observação foi claramente confirmada pela avaliação periódica do número de insetos mortos, partindo-se de uma população inicial de 60 insetos, correspondente ao confinamento de dez insetos por planta, em seis plantas representantes de cada variedade de capim.

Com base no critério de avaliação adotado, aproximadamente 20 insetos morreram nas primeiras 24 horas após o confinamento nas diferentes forrageiras, exceção feita para o a variedade Massai, na qual foram contados 14 insetos mortos. No controle representado pelo milho, somente um inseto foi encontrado morto (Tabela 2). Contagens feitas 48 horas após o estabelecimento dos insetos nas plantas revelaram a morte de 20 a 30 insetos para as forrageiras, enquanto dois indivíduos mortos foram observados para plantas de milho. Decorridas 72 horas, entre 30 e 40 cigarrinhas mortas foram verificadas para os capins e seis foram encontradas para as plantas de milho. Em nova avaliação realizada 96 horas após o início do ensaio, o número de insetos mortos variou de, aproximadamente, 50 a 60 insetos mortos para as variedades forrageiras, sendo encontrados sete mortos para as plantas de milho. Na última contagem conduzida 120 horas após a deposição das cigarrinhas nas plantas, 60 indivíduos mortos foram encontrados para as variedades Decumbens,

Marandu e Piatã, 56 e 54 insetos mortos foram verificados em plantas de Mombaça e Massai, respectivamente, enquanto oito foram constatados em plantas de milho.

Em termos percentuais (Tabela 2), dentro do período de 24 horas, ocorreu uma queda de aproximadamente 30% na sobrevivência dos insetos nos capins avaliados, excetuando-se a variedade Massai, na qual a população inicial foi reduzida em aproximadamente 20%. Após 48 horas do confinamento nas plantas, a população do vetor foi reduzida dentro de uma faixa de 40 a 50%. Estes valores aumentaram para aproximadamente 60%, quando, decorridas 72 horas após a deposição dos insetos nas distintas variedades das gramíneas. A população da cigarrinha revelou uma diminuição variável entre 80 e 90%, após um período de confinamento de 96 horas. Finalmente, quando da última avaliação, realizada 120 horas após a deposição dos insetos nos diferentes capins, foram constatadas reduções da ordem de 90 a 100%, em relação à população inicialmente confinada nas plantas. Em plantas de milho, usadas como controle, a redução na sobrevivência da população do vetor mostrou valores de, aproximadamente, 1, 3, 10, 11 e 13% para as avaliações feitas após 24, 48, 72, 96 e 120 horas, respectivamente, após o confinamento dos insetos nas plantas (Tabela 2).

Tabela 2. Contagem de insetos mortos e porcentagem de mortalidade de *Dalbulus maidis* infectivas em forrageiras, avaliada pela contagem de insetos mortos, em diferentes períodos (24, 48, 72, 96 e 120 horas), após o confinamento de dez insetos por planta, em seis plantas de cada espécie avaliada

	Número acumulado (Nº) e porcentagem de insetos mortos (%)									
Planta testada	**24 horas**		**48 horas**		**72 horas**		**96 horas**		**120 horas**	
	Nº	**(%)**	**Nº**	**(%)**	**Nº**	**(%)**	**Nº**	**(%)**	**Nº**	**(%)**
Decumbens	19	32	26	43	40	67	54	90	60	100
Marandu	18	30	29	48	36	60	59	98	60	100
Massai	14	23	26	43	36	60	49	82	56	93
Mombaça	20	33	27	45	38	63	48	80	54	90
Piatã	22	37	32	53	40	67	55	92	60	100
Milho	1	2	2	3	6	10	7	12	7	12

A análise dos dados revelou que, dentro dos períodos de avaliação correspondentes a 24, 48, 72, 96 e 120 horas não houve diferença significativa quanto à sobrevivência da cigarrinha nos diferentes capins inoculados (Tabela 3). Em contraste, os valores de sobrevivência das cigarrinhas em plantas de milho diferiram estatisticamente daqueles obtidos para as variedades das forrageiras testadas.

Tabela 3. Mortalidade média de *Dalbulus maidis* em forrageiras, avaliada pela contagem de insetos mortos, em diferentes períodos (24, 48, 72, 96 e 120 horas), após o confinamento de dez insetos por planta, em seis plantas de cada espécie avaliada

	Período de exposição				
Planta testada	**24 horas**	**48 horas**	**72 horas**	**96 horas**	**120 horas**
Decumbens	3,16±2,13 b	4,33±1,36 b	6,66±1,36 b	9,00±1,26 b	10,0±0,00 b
Marandu	3,00±1,67 b	4,16±1,16 b	6,00±0,89 b	9,83±0,40 b	10,0±0,00 b
Massai	2,33±1,03 b	4,33±1,21 b	6,00±0,63 b	8,16±1,16 b	9,33±0,81 b
Mombaça	2,33±2,58 b	4,50±3,01 b	6,33±2,25 b	8,00±2,44 b	9,00±1,67 b
Piatã	3,66±2,33 b	5,33±3,50 b	6,66±2,94 b	9,16±1,32 b	10,0±0,00 b
Milho	0,16±0,40 a	0,33±0,51 a	1,00±0,89 a	1,16±0,98 a	1,33±0,98 a

Os resultados apresentam a média e ± o erro padrão. Tratamentos com médias identificadas pela mesma letra, nas colunas, não diferem pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância $p<0,05$

Ensaios similares realizados por Haas (2005) mostraram que o capim colonião foi significativamente mais favorável à sobrevivência de *D. maidis*, quando em comparação com os demais capins estudados naqueles ensaios. É importante ressaltar que diversos trabalhos relatam uma grande restrição de hospedeiros que proporcionam a sobrevivência de *D. maidis*, excetuando-se, por exemplo, tripsacum (*Tripsacum dactyloides*) e teosinto (*Euchlaena mexicana*) (Tsai, 1988), consideradas hospedeiras alternativas. No entanto, estas espécies não foram registradas no Brasil. Espécies como aveia (*Avena fátua*), capim massambará (*Sorghum halepense*), centeio (*Hordeum vulgare*) e capim camalote (*Rottboellia* spp) têm sido mencionadas como “plantas-alimento’ para o inseto, porém não existe confirmação de seu papel

como hospedeiros alternativos da cigarrinha (Summers et al., 2004). Waquil (1997) relatou a presença de ovos e adultos da cigarrinha em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), levantando à suspeita de que esta espécie poderia atuar como possível hospedeiro, além do milho. Assim, até o momento, o milho parece continuar representando o único hospedeiro da cigarrinha vetora do fitoplasma, nas condições brasileiras. Em razão da íntima associação entre o fitoplasma e seu vetor, entender a dinâmica de sobrevivência do inseto é essencial para o entendimento do ciclo de vida do patógeno. A sobrevivência da cigarrinha em períodos de entressafra é ainda fonte de especulações, não havendo conhecimento suficiente para explicar como a cigarrinha poderia sobreviver aos períodos de ausência do milho no campo. Algumas evidências fornecem suporte a algumas hipóteses, tais como migrações das populações do vetor a longas distâncias (Pitre et al., 1967; Purcell, 1982; Oliveira et al., 2013); sobrevivência em áreas de milho onde a cultura se mantém no campo por longos períodos, devido ao uso de irrigação (Moya-Raygoza et al., 2007; Oliveira et al., 2013); e preservação da população de cigarrinhas em plantas de milho voluntárias que permanecem no campo durante a entressafra (Summers et al., 2004; Oliveira et al., 2013).

4.3 Potencial das plantas forrageiras como fonte de inóculo do patógeno para o milho

As plantas de milho, submetidas às cigarrinhas alimentadas nas plantas infectadas pertencentes às diferentes variedades de capins, não apresentaram nenhum sintoma indicativo da presença de fitoplasma, 45 dias após a inoculação. Produtos gerados pelo duplo PCR não mostraram amplificação de fragmentos genômicos do 16Sr DNA do fitoplasma, revelando, portanto, ausência do patógeno nos tecidos do hospedeiro.

Partindo-se da premissa de que o genótipo do milho era seguramente suscetível ao patógeno e que as plantas forrageiras, onde os insetos foram alimentados, eram portadoras do fitoplasma, pode-se inferir que a falha na transmissão provavelmente foi ocasionada por fatores ligados ao vetor. Falhas na transmissão de fitoplasmas podem estar relacionadas com diversos fatores e, por esta razão, não são ainda bem compreendidas. Estes fatores parecem ter implicações com o limite mínimo de células do patógeno no inseto vetor para que o processo de

inoculação possa ter sucesso. Este limite mínimo de células ou inóculo mínimo é fator crucial para determinar o início do processo de infecção do hospedeiro. Alguns estudos exploraram as possíveis razões da ocorrência de falhas na transmissão. Assim, o fitoplasma associado ao superbrotamente da macieira foi quantificado em insetos transmissores e não transmissores do vetor *Cacopsylla picta* Foerste, tendo sido evidenciado que uma quantidade mínima de células do fitoplasma era necessária para que o inseto se tornasse infectivo (Jarausch et al., 2007). Segundo Galetto (2009), o comprometimento da transmissão pode ser atribuído a: barreiras que impedem a colonização dos órgãos internos do inseto pelo fitoplasma; falha em injetar um nível limiar de fitoplasma na planta, devido ao título insuficiente do patógeno na saliva do vetor e deposição das células do patógeno em tecidos diversos além do floema, comprometendo o limite mínimo de inóculo necessário para desencadear a infecção. Falha temporária na transmissão pode ser explicada, de acordo com Wayadande e Nault (1996), pela alta plasticidade das cigarrinhas em relação à seleção de sítios teciduais, uma vez que a presença do patógeno na saliva a qualquer momento e a injeção de saliva durante a sondagem do floema são provavelmente pré-requisitos para o sucesso das transmissões de fitoplasmas. A conclusão exposta por estes últimos autores reforça que é imperativo uma quantidade mínima de células do patógeno necessária à transmissão e que este limite pode não ser alcançado devido à plasticidade do vetor. Ainda, é sugerido no trabalho de Fletcher e colaboradores (1998) que o título de fitoplasmas em insetos pode estar relacionado com a transmissão, pois estes patógenos devem vencer algumas etapas antes de serem injetados no tecido do hospedeiro. Assim, segundo os referidos autores, após a aquisição, os fitoplasmas têm que superar uma primeira barreira representada pelo epitélio do intestino médio; em seguida, enfrentar a etapa de circulação e multiplicação; finalmente, atravessar um segundo obstáculo para invadir as glândulas salivares, a partir das quais se moverão para as plantas juntamente com a saliva. Portanto, estas dificuldades poderão comprometer o limite mínimo de inóculo necessário para a infecção do hospedeiro.

A ausência de transmissão do fitoplasma de plantas forrageiras para o milho, evidenciada neste trabalho, indica que as diversas variedades de capins componentes do ensaio não atuaram como fonte de inóculo do patógeno. No caso, os resultados apontaram que as referidas forrageiras podem ser consideradas reservatórios para o agente do enfezamento vermelho do milho. Resultados semelhantes foram reportados

para este mesmo patossistema, envolvendo os capins colonião, marmelada e braquiária (Haas, 2010). Embora a presente pesquisa revelasse a permanência do fitoplasma nas forrageiras por somente 56 dias, isto não implica que em condições naturais estas plantas abriguem o patógeno por um período mais longo, pois no ensaio as plantas foram frequentemente podadas, o que pode ter colaborado para a dificuldade de recolonização por parte do patógeno.

A importância de se identificar plantas forrageiras comerciais como possíveis intermediárias na sobrevivência do fitoplasma, se justifica principalmente devido a sua característica de cultivo. Áreas de pastagens estão extensamente disseminadas em todo o território nacional, com quase 150 milhões de ha (IBGE, 2017). As forrageiras são comumente encontradas nas adjacências de campos de milho, consorciadas com esta cultura ou usadas em sistemas de sucessão. Ainda, devido à característica perene das forrageiras, estas plantas podem favorecer a sobrevivência do fitoplasma do enfezamento. Como complemento, por se tratar de plantas geneticamente próximas ao milho, pois pertencem à família Poaceae, a viabilidade de sucesso na interação com o fitoplasma pode ser favorecida, como demonstrada para os patossistemas milho/fitoplasma do enfezamento vermelho e os capins marmelada, colonião e braquiária (Haas, 2005), além de plantas de braquiária naturalmente infectadas pelo agente do enfezamento vermelho (Bedendo et al., 2004); existem alguns relatos na literatura como o patossistema cana-de-açúcar/fitoplasma associado à folha branca e as poáceas *Cenchrus setiger*, *C. ciliares* e *Eragrostis falcata* (Tran-Nguyen et al., 2000) e também à doença ‘grassy shoot’ e as gramíneas *Chloris inflata, Dactyloctenium aegyptium, D. radulans* e *Whiteochloa biciliata* (Blanche et al., 2003); e patossitema trigo/fitoplasma do nanismo azul e as gramíneas *Aegilops squarrosa*, *Avena fátua* e *Eragrostis cilianensis* (Wu et al., 2010).

Quando se trata da epidemiologia de doenças, plantas que são descritas como reservatórios podem atuar em uma importante via do ciclo do patógeno, operando como uma ponte verde durante períodos de entressafra, desempenhando um papel importante na sobrevivência e transmissão do patógeno (Rao et al., 2017). No entanto, ressalta-se que para o entendimento da real importância destas plantas, o conhecimento das estratégias de recuperação do inóculo é fundamental, para que estes hospedeiros não sejam caracterizados como “dead-end host”, ou seja, plantas que podem hospedar o patógeno, porém, sem papel epidemiológico na sua

disseminação (Duduk et al., 2018). Entretanto, um ponto importante também relacionado à epidemiologia é focalizado no trabalho de Haas (2010), o qual discute que o vetor principal pode não apresentar capacidade de realizar o retorno do inóculo do hospedeiro alternativo para o hospedeiro de interesse, demandando possivelmente um terceiro agente, que seja apto a se alimentar na planta fonte, adquirindo o patógeno e, consecutivamente, se alimentar na cultura de interesse e transmitir o patógeno com sucesso.

No caso do patossistema fitoplasma/milho, ainda não é claramente conhecido o processo de sobrevivência do patógeno nos períodos de entressafra da cultura. Esse agente é reconhecido como um parasita obrigatório e, por conseguinte, necessita de um hospedeiro vivo para sua sobrevivência e desenvolvimento. Assim, uma de suas formas de sobrevivência é colonizar o tecido de plantas vivas, sejam elas de interesse econômico ou não (Lee et al., 2000). No caso de hospedeiros alternativos, o patógeno necessita ser transmitido da cultura principal para os hospedeiros alternativos e, a partir destes hospedeiros retornar para a cultura de interesse. Para o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho, foram descritos alguns hospedeiros alternativos, porém, sem descrição do processo de retorno ou de transmissão do hospedeiro alternativo para a cultura de interesse, usando-se *D. maidis* (Haas, 2006; Nault,1980). Em concordância com esta discussão está o trabalho de Haas (2010), no qual foi revelado que os capins marmelada e braquiária podem servir como reservatório do fitoplasma, porém não houve comprovação de sua atuação como fonte de inóculo para o milho. Outro ponto ligado à epidemiologia do enfezamento vermelho é aquele relacionado à identificação de espécies alternativas que abrigam o fitoplasma, porém as plantas não exibem sintomas. O presente trabalho mostrou que as plantas de todos os capins inoculados com o fitoplasma se apresentaram assintomáticas, no entanto foram identificados como portadores por meio dos testes moleculares. Resultados idênticos foram reportados para os capins colonião, marmelada e braquiária nos ensaios conduzidos por Haas (2005 e 2010). Em reforço a estes achados, recentemente foi relatada a presença de fitoplasma em plantas assintomáticas de braquiária (*B. decumbens*) cultivadas em áreas de pastagens (Fugita et al., 2017). Plantas portadoras de fitoplasmas que não exibem sintomas se constituem em um sério agravante para a identificação de possíveis hospedeiros alternativos em condições de campo, o que implica em maior dificuldade para a descoberta de hospedeiro alternativos do patógeno que possam garantir a

sobrevivência do mesmo ou servirem como fonte de inóculo para espécies de interesse econômico.

5. CONCLUSÕES

As plantas forrageiras das espécies *Panicum maximum* cv. Mombaça, *P. maximum* x *P. infestum* cv. Massai, *Brachiaria bizantha* cv Marandu, *B. brizantha* cv. Piatã e *B. decumbens* cv. Basilisk (popularmente conhecida por Decumbens) podem servir de reservatório para o fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho.

O agente do enfezamento vermelho do milho pode persistir nos tecidos das diferentes variedades de forrageiras por pelo menos 56 dias após a inoculação por meio de cigarrinhas infectivas de *D. maidis,* mesmo após o corte da parte aérea.

D. maidis apresenta baixa sobrevivência após 48 horas nas referidas forrageiras.

As espécies forrageiras não serviram como fonte de inóculo do fitoplasma para as plantas de milho, quando adultos de *D. maidis* alimentados nestas plantas foram transferidos para a espécie cultivada

REFERÊNCIAS

ALTSTATT G.E. A new corn disease in the Rio Grande Valley. Plant Disease Reporter, St.Paul, v.29, p.533-534, 1945.

AMMAR E.D., GASPARICH G.E., HALL D.G., HOGENHOUT S.A. Spiroplasma-like organisms closely associated with the gut in five leafhopper species (Hemiptera: Cicadellidae). **Arch. Microbiol**. v. 193, p. 35–44, 2011.

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

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

BEDENDO I.P., BRUNELLI K.R., KIMATI H., RIBEIRO L.F. Ocorrência de fitoplasma em plantas de capim marmelada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, Supl., p.187, 2004.

BEDENDO I.P. Fitoplasmas e espiroplasmas. In: AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, p. 255 - 270, 2011.

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

BORÉM A., GALVÃO J.C.C., PIMENTEL M.A. **Milho: do plantio a colheita**. Viçosa: UFV, 351p., 2015.

Companhia nacional de abastecimento – CONAB. **Boletim de grãos 2017.** Disponível em:< http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_04_17_17_20_55_boletim_graos_a br_2017.pdf> Acesso em junho de 2018.

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

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

DOURADO NETO D., FANCELLI A.L. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360p.

DOYLE J.J., DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry**, New York, v. 19, p.11 - 15, 1987.

DUDUK B., STEPANOVIĆ J., YADAV A., RAO G.P. Phytoplasmas in Weeds and Wild Plants. In: **Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I**. Springer, Singapore, 2018. p. 313-345.

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

EMBRAPA - **Cultivo do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2012. (Sistemas de Produção, 1).

FERREIRA D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FLETCHER J., WAYADANDE A., MELCHER U., YE F. The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. **Phytopathology**, v. 88, n. 12, p. 1351-1358, 1998.

FUGITA J. M. S., PEREIRA T.B.C., BANZATO T.C., KITAJIMA E.W., SOUTO E.R., BEDENDO I.P. Occurrence of a subgroup 16SrIII-J phytoplasma in non-symptomatic *Brachiaria decumbens* cultivated in a grazing área. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 500-503, 2017.

GALETTO L., NARDI M., SARACCO P., BRESSAN A., MARZACHÌ C., BOSCO D. Variation in vector competency depends on chrysanthemum yellows phytoplasma distribution within Euscelidius variegatus. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 131, n. 2, p. 200-207, 2009.

GARNIER X.M., FOISSAC P., GAURIVAUD F., LAIGRET J., RENAUDIN C., SAILLARD J., BOVÉ M. Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. Comptes rendus de l'Académie des Sciences. Paris, **Sciences de la vie / Life Sciences**, v. 324, p. 923 - 928, 2001.

GRANADOS R.R. Electron microscopy of plants and insect vectores infected with the corn stunt disease agent. **Contribution Boyce Thomposon Institute**, v. 24, p. 173-187, 1969.

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

GUTIÉRREZ G.C., ALMARAZ R.L.T. FITOPLASMAS: SÍNTOMAS Y CARACTERÍSTICAS MOLECULARES. **Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, v. 14, n. 2, p. 81 - 87, 2008.

HAEGELE J.W., COOK K.A., NICHOLS D.M., BELOW F.E. Changes in nitrogen use traits associated with genetic improvement for grain yield of maize hybrids released in different decades. **Crop Science**, Madison, v. 53, p. 1256-1268, 2013.

HARRISON N.A., RICHARDSON P.A., TSAI J.H. Assay for detection of phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. **Plant Disease**, v. 80, p. 263 -269, 1996.

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

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

LEE I.M., DAVIS R.E., GUNDERSEN-RINDAL D.E. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 221 - 225, 2000.

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

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

LEE S., KIM C., CHA B. Migration and Distribution of Graft-inoculated Jujube Witches-broom Phytoplasma within a *Cantharanthus roseus* Plant. **The Plant Pathology Journal**, v. 28, n. 2, p. 191-196, 2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário**. Número de estabelecimentos agropecuários com bovinos, Efetivos, Venda e Produção de leite, por grupos de área de pastagem e grupos de área total - resultados preliminares 2017. Disponível em: < https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6783> Acesso em julho de 2018.

JARAUSCH B., FUCHS A., SCHWIND N., KRCZAL G., JARAUSCH W. *Cacopsylla picta* as most important vector for '*Candidatus* Phytoplasma mali' in Germany and neighbouring regions. **Bulletin of insectology**, v. 60, n. 2, p. 189-190, 2007.

MAGALHÃES P.C., DURÃES F.O.M., CARNEIRO N.P., PAIVA E. **Fisiologia do milho**. Circular técnica 22, Sete Lagoas, 2002, 23p.

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

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

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

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

OLIVEIRA, C.M., LOPES J.R.S. Cigarrinha-do-milho: aspectos taxonômicos e ecológicos, sobrevivência na entressafra. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. (Ed.) **Doença em milho:** molicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 61-88.

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

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

OLIVEIRA C. M., OLIVEIRA O., CANUTO M., CRUZ I. Controle químico da cigarrinha-do-milho e incidência dos enfezamentos causados por molicutes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 297-303, 2007.

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

ÖZBECK E., MILLER S.A., MEULIA T., HOGENHOUT S.A. Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. **J. Invertebr. Pathol**., v. 82, p.167–171, 2003.

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

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

RAO G.P., MADHUPRIYA T.A.K, DUBEY D.K. Identification of *Ocimum canum* as possible alternative host of sesame phyllody phytoplasma strain 16SrI-B in India. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 7, n. 1, p. 62-65, 2017.

RODDEE J., KOBORI Y., HANBOONSONG Y. Multiplication and Distribution of Sugarcane White Leaf Phytoplasma Transmitted by the Leafhopper, *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) (Hemiptera: Cicadellidae), in Infected Sugarcane. **Sugar Tech,** v. 20, n. 4, p. 445-453, 2018.

SALAR P., CHARENTON C., FOISSAC X., MALEMBIC-MAHER S. Multiplication kinetics of Flavescence dorée phytoplasma in broad bean. Effect of phytoplasma strain and temperature. **European journal of plant pathology**, v. 135, n. 2, p. 371-381, 2013.

SCHURTLEFF M.C. Compendium of corn diseases. 2. ed. St. Paul: **American Phytopathological Society**, 1986. 105p.

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, n. 8, p. 921-928, 2003.

SUMMERS C.G., NEWTON A.S. Jr., 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.

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

TSAI J.H. Bionomics of *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott), a vector of mollicutes and virus (Homoptera: Cicadellidae). In: **Mycoplasma Diseases of Crops**. Springer, New York, NY, 1988. p. 209-221.

TOFFANELLI C.M. **Efeito do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e da população de vetores infectivos sobre sintomas e componentes de produção**. 2001. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

WAQUIL J.M. Amostragem e abundância de cigarrinhas e danos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) em plântulas de milho. **An. Soc. Entomol**. 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). **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado** (ALICE), 1999.

WAYADANDE A. C., NAULT L.R. Leafhoppers on leaves: an analysis of feeding behavior using conditional probabilities. **Journal of insect behavior**, v. 9, n. 1, p. 3-22, 1996.

WU Y., HAO X., LI Z., GU P., AN F., XIANG J., WANG H., LUO Z., LIU J., XIANG Y. Identification of the phytoplasma associated with wheat blue dwarf disease in China. **Plant Disease**, v. 94, n. 8, p. 977-985, 2010.

XUE Y., WARBURTON M.L., SAWKINS M., ZHANG X., SETTER T., YUNBI X., GRUDLOYAMA P., GETHI J., RIBAULT J.M., LI W., ZHANG X., ZHENG Y., YAN J. Genome-wide association analysis for nine agronomic traits in maize under well-watered and water-stressed conditions. **Theoretical and applied genetics**. v. 5, p 2587-2596, 2013.