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

**Efeito de *maize bushy stunt phytoplasma* na sobrevivência de
Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae)
sobre milho e plantas infestantes**

Anderson Ramos

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

**Piracicaba
2016**

Anderson Ramos
Engenheiro Agrônomo

**Efeito de *maize bushy stunt phytoplasma* na sobrevivência de *Dalbulus maidis*
(DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sobre milho e plantas infestantes**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

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

Piracicaba
2016

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

Ramos, Anderson

Efeito de *maize bushy stunt phytoplasma* na sobrevivência de *Dalbulus maidis*
(DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sobre milho e plantas infestantes /
Anderson Ramos. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -
Piracicaba, 2016.
71 p. : il.

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

1. Cigarrinha-do-milho 2. Fitoplasma do milho 3. Sobrevivência na entressafra
4. Plantas hospedeiras I. Título

CDD 633.15
R175e

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

Ao meu avô João,

Por todos os anos de amor, carinho e dedicação.

DEDICO

*A todos os amigos e familiares
que direta ou indiretamente participaram desta jornada*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço professor Dr. João Lopes pela oportunidade primeiramente de estágio e posterior mestrado, por todos os ensinamentos durante esses cinco anos no laboratório, pela amizade, paciência e suporte para o desenvolvimento do projeto, além da grande contribuição para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos companheiros e amigos de trabalho Arthur, Mariana, Carla, Karina, Karen, Nathalie, Juliana, Joyce, Tiago, Javier, Gerane, Rodrigo, Maria Cristina, Thiago, Willis, Lemuel, Taciana, Luiza, Danilo, Ricardo, Gabriel Passos, Gabriel Frasseto, Letícia e Maria Isabel, os quais me ajudaram de alguma forma na execução desta pesquisa.

Agradeço em especial ao Arthur, Mariana, Ticyana e Mayara por terem me ajudado com esse trabalho de diversas formas, e principalmente pela paciência que tiveram em tirar minhas dúvidas, e a Andrea Raquel Martins Corrêa pela dedicação, paciência e auxílio.

Aos colegas de pós-graduação pela convivência durante as disciplinas, e pelos momentos de descontração, em especial à Fernanda, Mariana, Rafaela e Mayara.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia, os quais contribuíram imensamente para o meu aprendizado.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia, sempre muito atenciosos.

Agradeço também a toda minha família.

Quem olha para fora, sonha; quem olha para dentro, desperta.

Carl G. Jung

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Fitoplasmas	17
2.1.1 Classificação Taxonômica	17
2.1.2 Genoma e metabolismo	18
2.1.3 Hospedeiros e vetores de fitoplasmas	19
2.2 Enfezamento do milho.....	20
2.2.1 Molicutes associados aos enfezamentos	21
2.2.2 Espécies vetoras de molicutes em milho.....	21
2.2.3 Processo de transmissão dos molicutes	22
2.2.4 Sintomas dos enfezamentos	23
2.2.5 Sobrevivência da cigarrinha vetora e do fitoplasma na entressafra	23
2.2.6 Efeitos dos fitoplasmas nos insetos vetores.....	24
3 METODOLOGIA.....	27
3.1 Criação de cigarrinhas livres de fitoplasma	27
3.2 Obtenção de plantas-fonte do fitoplasma do milho	28
3.3 Plantas daninhas utilizadas nos experimentos.....	29
3.4 Inoculação de plantas daninhas com o fitoplasma do milho.....	30
3.5 Transmissão de MBSP por espécies de cigarrinhas presentes na vegetação espontânea.....	32
3.6 Avaliação da sobrevivência de <i>D. maidis</i> em plantas daninhas.	35
3.7 Efeito da infecção de plantas de milho por MBSP sobre a oviposição e sobrevivência de imaturos de <i>D. maidis</i> e <i>A. albidula</i>	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Inoculação de plantas daninhas com o ‘maize bushy stunt phytoplasma’ (MBSP).....	39
4.2 Avaliação da sobrevivência de <i>D. maidis</i> em plantas daninhas.	45
4.3 Transmissão de MBSP por espécies de cigarrinhas presentes na vegetação espontânea.....	53

4.4 Efeito da infecção de plantas de milho por MBSP sobre a oviposição e sobrevivência de imaturos de <i>D. maidis</i> e <i>A. albidula</i>	56
5 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS	63

RESUMO

Efeito de *maize bushy stunt phytoplasma* na sobrevivência de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sobre milho e plantas infestantes

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância para o agronegócio brasileiro, que enfrenta diversos problemas fitossanitários. Dentre as doenças destaca-se o enfezamento vermelho, que está associado ao mollicute fitopatogênico, 'maize bushy stunt phytoplasma' (MBSP). Este fitoplasma é transmitido por um grupo restrito de cicadelídeos (Hemiptera: Cicadellidae), constituído principalmente por espécies do gênero *Dalbulus*; no Brasil é relatada a presença de apenas uma espécie vetora, a cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott). A cigarrinha-do-milho possui profunda associação e co-evolução com o milho, sendo considerada específica dessa cultura. No México há relatos de *D. maidis* se desenvolvendo em espécies selvagens do gênero *Zea* e *Tripsacum*. Mas no Brasil a única planta hospedeira conhecida de *D. maidis* é o milho. Portanto, não se sabe como esta cigarrinha, assim como o fitoplasma por ela transmitido, sobrevivem ao longo período de entressafra que ocorre em algumas regiões brasileiras. Estudos têm demonstrado que a presença de fitopatógenos na planta e nos insetos e as alterações por eles causadas na fisiologia dos mesmos, podem melhorar desempenho biológico do inseto vetor. No México, MBSP é altamente patogênico a outras espécies de cigarrinhas do gênero *Dalbulus* que se alimentam no milho e competem com *D. maidis*. Considerando-se que no Brasil outras espécies de cigarrinhas apresentam pequenas populações em milho, postula-se que este fitoplasma as afete negativamente, reduzindo sua capacidade de competição com *D. maidis*. O presente trabalho investigou possíveis plantas hospedeiras alternativas do inseto e do fitoplasma, outros possíveis vetores do MBSP, e o efeito do fitoplasma na sobrevivência de *D. maidis* e em alguns parâmetros biológicos desse vetor e do cicadelídeo *Agallia albidula* Uhler, espécie não vetora, presente na vegetação espontânea da cultura do milho. Dez espécies de plantas daninhas em milharais foram submetidas à inoculação de MBSP com adultos infectivos de *D. maidis*, mas em nenhuma delas foi detectada a infecção pelo fitoplasma, indicando que o fitoplasma possui alta especificidade em relação a plantas hospedeiras. Duas espécies de cicadelídeos comuns na vegetação rasteira de cultivos de milho, *A. albidula* e *Planicephalus flavicosta* (Stål) foram testadas como vetores de MBSP, e nenhuma delas foi capaz de transmitir o patógeno para o milho, indicando que a especificidade de vetores também é elevada. A infecção de *D. maidis* por MBSP afetou negativamente a sobrevivência de adultos deste inseto vetor. Por outro lado, plantas de milho infectadas por MBSP estimularam a oviposição das cigarrinhas *D. maidis* e *A. albidula*. Entretanto, a sobrevivência de ninfas de *A. albidula* foi muito baixa tanto em plantas saudáveis quanto em plantas infectadas pelo fitoplasma, indicando que o milho, independentemente do fitoplasma, não é um bom hospedeiro para desenvolvimento de *A. albidula*.

Palavras-chave: Cigarrinha-do-milho; Fitoplasma do milho; Sobrevivência na entressafra; Plantas hospedeiras

ABSTRACT

Effect of maize bushy stunt phytoplasma on *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) survival on corn and weeds

Corn (*Zea mays* L.) is an important crop for Brazilian agribusiness, but it is affected by various pests and diseases. A stunting disease associated with the phytopathogenic mollicute, maize bushy stunt phytoplasma (MBSP), is one of the main problems. This phytoplasma is transmitted by a narrow range of leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae), mainly in the genus *Dalbulus*. In Brazil, the only known vector is the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott). The corn leafhopper has a deep association and co-evolution with corn, and it is thought to be specific to this crop. In Mexico there are reports of *D. maidis* developing on wild species of *Zea* and *Tripsacum*. Because corn is the only known host of *D. maidis* in Brazil, it is unknown how this leafhopper and MBSP survive the long corn off-season that occurs in some Brazilian growing regions. Studies have shown that the presence of pathogens in plants and insects and the physiological changes caused by them can improve the biological performance of insect vectors. In Mexico, MBSP is highly pathogenic to some *Dalbulus* species that feed on corn and compete with *D. maidis*. Considering that in Brazil other leafhopper species have small populations in corn, it is postulated that MBSP may negatively affect them and reduce their ability to compete with *D. maidis*. The current study investigated possible alternative host plants of MBSP and *D. maidis*, other possible leafhopper vectors of MBSP and the effects of the phytoplasma on *D. maidis* survival and in some biological parameters of this vector and of *Agallia albidula* Uhler, a non-vector leafhopper present in the weedy vegetation of corn fields. Ten weed species commonly present in corn fields were inoculated with MBSP by infective adults of *D. maidis*, but none of them became infected with the phytoplasma, suggesting that MBSP has high host plant specificity. Two leafhopper species that inhabit the weedy vegetation of corn fields, *A. albidula* e *Planicephalus flavicosta* (Stål), were tested as vectors of MBSP, but none of them was able to transmit the pathogen to corn, indicating that the vector specificity of this phytoplasma is also high. Infection of *D. maidis* by MBSP negatively affected adult survival. On the other hand, infection of corn plants by MBSP induced higher oviposition by *D. maidis* and *A. albidula*. However, the survival of *A. albidula* nymphs was very low not only on infected plants, but also on healthy corn plants, indicating corn is not a suitable developmental host for *A. albidula*, regardless of the phytoplasma infection.

Keywords: Corn leafhopper; Maize bushy stunt phytoplasma; Off-season survival; Host plants

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância para o agronegócio brasileiro, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial, com uma produção de 84 milhões de toneladas na safra de 2014/2015, perdendo apenas para Estados Unidos e China (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015). Apesar de o Brasil ocupar o posto de terceiro maior produtor mundial de milho, o rendimento da produção é baixo quando comparado aos Estados Unidos e a média mundial (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2016). Muitas doenças são negligenciadas e poucos dados a respeito do impacto na produção estão disponíveis.

Dentre as doenças negligenciadas do milho, destacam-se os enfezamentos vermelho e pálido que são associados aos mollicutes fitopatogênicos, 'maize bushy stunt phytoplasma' (MBSP) e *Spiroplasma kunkelli*, respectivamente. Com o cultivo de milho de 2º safra, também chamado de "milho safrinha", esses patógenos ganharam grande importância econômica gerando perdas consideráveis na cultura (SCOTT et al., 1977; OLIVEIRA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2002a; OLIVEIRA et al., 2004). Juntamente com o vírus da risca do milho, os mollicutes associados aos enfezamentos podem formar um complexo de três patógenos na mesma planta; os sintomas nesse caso assemelham-se aos do enfezamento vermelho (LOPES; OLIVEIRA, 2004).

Esses mollicutes são transmitidos por espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) que colonizam o milho e/ou plantas filogeneticamente próximas, tais como teosintos (*Zea* spp.) e *Tripsacum* (MADDEN; NAULT, 1983). Entre as cigarrinhas que ocorrem no México, são relatadas como vetoras de MBSP as espécies *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), *D. eliminatus* (Ball), *D. gelbus* DeLong, *D. guevarai* DeLong, *D. quinquenotatus* DeLong & Nault, *D. tripsacoides* DeLong & Nault e *Baldulus tripsaci* Kramer & Whitcomb (NAULT, 1983). No Brasil é relatada apenas a presença da espécie *D. maidis*, conhecida popularmente como cigarrinha-do-milho (LOPES; OLIVEIRA, 2004). A cigarrinha *D. maidis* possui forte associação e co-evolução com o milho, reproduzindo-se apenas nesta cultura. Entretanto, também há relatos de *D. maidis* se desenvolvendo em espécies do gênero *Zea* e *Tripsacum*, as quais não são encontradas infestando campos de milho no Brasil (NAULT, 1983; NAULT et al., 1983).

No Brasil a única planta hospedeira conhecida de *D. maidis* é o milho. Não se sabe como a cigarrinha e os mollicutes por ela transmitidos sobrevivem no período de entressafra que ocorre em alguns estados, pois não são relatados hospedeiros alternativos para essa espécie de inseto e para os patógenos no Brasil (OLIVEIRA; LOPES, 2004b).

Estudos têm demonstrado que a presença de fitopatógenos na planta e as alterações por eles causadas na fisiologia da mesma podem aumentar a atratividade e também melhorar o desempenho biológico do inseto vetor (FERERES; MORENO, 2009; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ et al., 2004; MCELHANY; REAL; POWER, 1995). Kingdom & Hogenhout (2007) ao inocularem o fitoplasma AY-WB (Aster yellow-witch's Broom) em *Arabidopsis thaliana*, comprovaram que este fitoplasma foi capaz de transformar esta planta em hospedeira, de modo que o fitoplasma pudesse ser adquirido pela cigarrinha *D. maidis*, que naturalmente não se alimenta em *A. thaliana*, nem é vetora de AY-WB.

Embora *D. maidis* seja específico de milho, é possível que o fitoplasma do milho amplie a gama de potenciais hospedeiros desta espécie de cigarrinha entre plantas da vegetação espontânea, especialmente em períodos de entressafra do milho, quando há falta do hospedeiro primário. Em contrapartida, isto permitiria ao fitoplasma explorar novas plantas hospedeiras e, conseqüentemente, ser exposto a outras cigarrinhas potenciais vetoras, ampliando sua chance de sobrevivência e perpetuação de inóculo nas áreas de cultivo. No México, MBSP se mostrou altamente patogênico a certas espécies de cigarrinhas do gênero *Dalbulus* que se alimentam no milho e competem com *D. maidis* (MADDEN; NAULT, 1983). Considerando-se que no Brasil outras espécies de cigarrinhas apresentam pequenas populações em milho (OLIVEIRA, 1996; OLIVEIRA, 2000; OLIVEIRA et al., 2013), postula-se que este fitoplasma as afete negativamente reduzindo sua capacidade de competição com *D. maidis*.

O trabalho teve o objetivo de identificar possíveis plantas daninhas como hospedeiras alternativas de MBSP e de *D. maidis* no período de entressafra do milho, novas espécies de cigarrinhas vetoras do fitoplasma em milho e investigar o efeito da infecção pelo fitoplasma na sobrevivência *D. maidis*, bem como no desenvolvimento de *D. maidis* e *Agallia albidula* Uhler quando expostas a plantas infectadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fitoplasmas

Fitoplasmas são bactérias sem parede celular, pleomórficas, sendo a célula envolvida somente por uma membrana (OSHIMA; MAEJIMA; NAMBA, 2013; MARCONE, 2014). Esses microorganismos infectam uma grande gama de plantas, que compreende desde espécies herbáceas até plantas arbóreas. Mais de 700 plantas já foram descritas com infecção por fitoplasmas, muitas delas de grande importância econômica (OSHIMA; MAEJIMA; NAMBA, 2013; WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

Estes microorganismos são parasitas intracelulares obrigatórios transmitidos por insetos vetores da ordem Hemiptera e colonizam os vasos do floema. De forma geral, os sintomas apresentados pelas plantas colonizadas são amarelecimento, nanismo, proliferação de ramos, filodia (conversão de órgãos florais em folhas) e virescência (flores com coloração verde) (OSHIMA; MAEJIMA; NAMBA, 2013; WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

As doenças causadas por estes organismos foram atribuídas aos vírus, por apresentarem sintomas parecidos com doenças viróticas (MARAMOROSCH, 1958). Após o surgimento da técnica de microscopia eletrônica, cientistas detectaram a presença de corpos pleomórficos no floema de plantas sintomáticas, identificando e associando estes organismos às doenças conhecidas como “amarelos” (DOI et al., 1967).

2.1.1 Classificação Taxonômica

A classificação taxonômica atual é feita pela análise da região 16S do DNA ribossomal e de alguns genes conservados dentro do grupo, por meio de técnicas moleculares. Sua classificação taxonômica ainda não é possível já que estes organismos ainda não são praticamente cultivados em meio de cultura artificial, o que impede, inclusive o fechamento dos postulados de Koch, existindo apenas um relato recente do cultivo de fitoplasmas (CONTALDO et al., 2012). Desta forma estes organismos recebem a nomenclatura ‘*Candidatus*’ antes do gênero em que são

provisoriamente classificados (FIRRAO et al., 2004; OSHIMA; MAEJIMA; NAMBA, 2013; MARCONE, 2014).

Os fitoplasmas são classificados dentro do domínio *Bactéria*, filo *Tenericutes*, classe dos *Mollicutes*, com base em sua ultraestrutura e morfologia (DOI et al., 1967). Com o surgimento de técnicas moleculares estes organismos foram reclassificados na ordem *Acholeplasmatales* e na família *Acholeplasmataceae* (FIRRAO et al., 2004).

2.1.2 Genoma e metabolismo

Entre os organismos do domínio bactéria, os fitoplasmas apresentam os menores genomas, com tamanhos entre 530kb e 1350kb, com algumas exceções que apresentam genomas um pouco maiores (OSHIMA; MAEJIMA; NAMBA, 2013; MARCONE, 2014). O genoma destes organismos é constituído por um cromossomo e um ou mais plasmídeos e grande parte da informação genética presente no genoma está relacionada com a síntese de proteínas para replicação, transcrição, tradução e translocação de proteínas para o meio (TORUÑO et al., 2010; OSHIMA; MAEJIMA; NAMBA, 2013; MARCONE, 2014).

O genoma se assemelha muito à aquele de bactérias endossimbiontes. Parte da informação necessária à maquinaria metabólica foi perdida, seja porque muitas das moléculas necessárias ao desenvolvimento se encontram disponíveis no meio intracelular do hospedeiro ou porque muitas dessas moléculas da maquinaria metabólica pertencem ao grupo de moléculas chamado MAMPs (Microbe-associated molecular patterns) que desencadeiam a resposta imune do hospedeiro (TORUÑO et al., 2010; SUGIO et al., 2011b; OSHIMA; MAEJIMA; NAMBA, 2013; MARCONE, 2014).

Outro aspecto importante a salientar é a presença de informação genética para síntese de proteínas efetoras, moléculas produzidas e secretadas na célula do hospedeiro para facilitar a multiplicação e colonização pelo parasita. Estas moléculas compreendem toxinas, análogos de hormônios e outras moléculas que alteram a fisiologia do hospedeiro (BAI et al., 2006, 2009; BAI; AMMAR; HOGENHOUT, 2007; SUGIO et al., 2011a, 2011b).

Foi demonstrado que algumas dessas proteínas efetoras interferem em fatores de transcrição da planta hospedeira, atrasando seu desenvolvimento, e

diminuindo a resposta imune da planta contra a herbivoria, aumentando a preferência e até mesmo o desempenho do(s) inseto(s) vetor(es) e mesmo não vetores na planta colonizada pelo fitoplasma (BAI; AMMAR; HOGENHOUT, 2007; KINGDOM; HOGENHOUT, 2007; BAI et al., 2009; SUGIO et al., 2011a, 2011b; SUGIO; MACLEAN; HOGENHOUT, 2014). Este atraso no desenvolvimento da planta e aumento no desempenho do vetor maximiza as chances de transmissão do fitoplasma no ambiente, desta forma a melhora do desempenho do vetor e o atraso na senescência da planta possibilitam uma melhora no desempenho biológico do fitoplasma (SUGIO et al., 2011b). Também são relatadas a secreção destas proteínas em seus insetos vetores, porém ainda são poucos os trabalhos a respeito das alterações que essas proteínas induzem no vetor (BAI et al., 2006; BAI; AMMAR; HOGENHOUT, 2007; OSHIMA et al., 2011).

2.1.3 Hospedeiros e vetores de fitoplasmas

No Brasil até o momento pouco se sabe a respeito da diversidade de vetores de fitoplasmas. A grande parte dos estudos encontrados são de identificação das espécies de fitoplasmas e seus hospedeiros. São relatadas 15 famílias de plantas hospedeiras de fitoplasmas: Ampelidaceae, Apocynaceae, Arecaceae, Asteraceae, Begoniaceae, Brassicaceae, Curcubitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Nyctagenaceae, Passifloraceae, Poaceae, Rosaceae e Solanaceae. Os fitoplasmas descritos atualmente no Brasil estão distribuídos em nove grupos: 16Srl, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXII, 16SrXIII, 16SrXV, dentre eles destacam-se os grupos 16Srl e 16SrIII, com maior número de representantes identificados (MONTANO; BRIOSO; PIMENTEL, 2007; MONTANO; CUNHA JUNIOR; PIMENTEL, 2011).

Atualmente apenas insetos da ordem Hemiptera são descritos como vetores de fitoplasmas. Os insetos desta ordem possuem características importantes que os fazem vetores eficientes destes fitopatógenos. Entre elas, possuem aparelho bucal sugador labial, que permite alimentar-se em tecidos internos da planta sem a destruição dos mesmos. São insetos hemimetábolos, ou seja, possuem metamorfose incompleta possibilitando a imaturos e adultos compartilharem o mesmo nicho ecológico. Desta forma, ambos os estágios são capazes de transmitir o patógeno. Na ordem Hemiptera três superfamílias tem espécies descritas como

vetores de fitoplasmas: Membracoidea e Fulgoroidea dentro da subordem Auchenorrhyncha e Psylloidea, dentro da subordem Sternorrhyncha. As duas primeiras superfamílias compreendem a maioria das espécies descritas e a última apresenta algumas poucas espécies descritas. A superfamília Membracoidea é a que possui maior número de espécies vetoras descritas, sendo todas as espécies restritas à família Cicadellidae. Psylloidea em situação oposta possui o menor número de espécies vetoras descritas, todas pertencendo à família Psyllidae. Fulgoroidea é a superfamília que apresenta maior diversidade de famílias com espécies vetoras, destacando-se as famílias: Derbidae, Flatidae, Cixiidae e Delphacidae (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006; WILSON; WEINTRAUB, 2007).

2.2 Enfezamento do milho

Os enfezamentos causados no milho foram relatados pela primeira vez em 1945 nos Estados Unidos, no estado do Texas (ALTSTATT, 1945). Também foram relatados no México e em diversos países das Américas Central e do Sul (DAVIS; WORLEY, 1973; NAULT; GORDON; LOAYZA, 1981; HRUSKA; GLADSTONE; OBANDO, 1996; LASTRA; TRUJILLO, 1976) No Brasil o primeiro relato de enfezamentos de milho ocorreu no início da década de 70, sendo nesta época consideradas doenças de importância secundária, sem grandes prejuízos à produção de milho no Brasil (COSTA; KITAJIMA; ARRUDA; 1971).

Os enfezamentos do milho passaram a ter maior importância a partir da década de 80 com o aumento dos plantios de milho safrinha, que possibilitou a presença da cultura durante um maior tempo no campo ao longo do ano, garantindo a permanência da população do inseto vetor no campo e aumentando a fonte de inóculo dos fitopatógenos (SCOTT; ROSENKRANZ; NELSON, 1977; OLIVEIRA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2002a). O milho da 2ª safra ou “safrinha” é aquele que mais sofre com a presença de enfezamento, sendo observada maior incidência quando comparada à safra de verão do milho (OLIVEIRA et al., 2002a).

Oliveira et al. (2003), avaliando a incidência de enfezamento no milho no estado do Paraná, estimou uma perda de 16,5 milhões de dólares apenas para este estado. Os níveis de incidência nas lavouras avaliadas neste trabalho variaram entre 6,2% a 49,9%, com uma média 20,7% de plantas sintomáticas.

2.2.1 Molicutes associados aos enfezamentos

Os enfezamentos do milho estão associados a dois molicutes pertencentes a ordens distintas. O espiroplasma do milho *Spiroplasma kunkelii* pertencente à ordem *Entomoplasmatales* e o fitoplasma do milho 'maize bushy stunt phytoplasma' (MBSP) que, como mencionado anteriormente pertence à ordem *Acholeplasmatales* (FIRRAO et al., 2004; YU et al., 2009).

O enfezamento pálido do milho é causado pelo *S. kunkelii*, enquanto que o enfezamento vermelho é associado ao 'MBSP'. Ambos os molicutes juntamente com um vírus, o vírus da risca do milho (*Maize rayado fino virus*, MRFV), podem encontrar-se associados na mesma planta formando o complexo do enfezamento, pois estes patógenos possuem em comum as mesmas espécies de insetos vetores (NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 2004).

2.2.2 Espécies vetoras de molicutes em milho

Várias espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) do gênero *Dalbulus* e uma espécie do gênero *Baldulus* são vetoras dos molicutes associados aos enfezamentos, tais como, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), *D. eliminatus* (Ball), *D. gelbus* DeLong, *D. guevarai* DeLong, *D. quinquenotatus* DeLong & Nault, *D. tripsacoides* DeLong & Nault. Entre elas, a espécie *D. maidis* é considerada a principal vetora (LOPES; OLIVEIRA, 2004; MADDEN; NAULT, 1983). O gênero *Dalbulus* é composto por cigarrinhas de porte pequeno, com adultos medindo de 3 a 4,4 mm de comprimento. As fêmeas apresentam maior tamanho em relação aos machos. Entre as espécies deste gênero a coloração pode variar de amarelo, alaranjado ou marrom (OLIVEIRA, 1996).

As espécies do gênero *Dalbulus* e *Baldulus* se alimentam no floema das plantas hospedeiras, o que torna possível a transmissão dos molicutes. Estes insetos pertencem à família Cicadellidae e tem como provável centro de origem os altos vales da região central do México (NAULT et al., 1983). No Brasil, apenas a cigarrinha vetora *D. maidis* tem sido encontrada nas lavouras de milho (LOPES; OLIVEIRA, 2004).

O ciclo biológico da espécie *D. maidis* varia principalmente com a temperatura. Esta espécie possui um ciclo médio para a temperatura de 26,5°C e

umidade relativa de 50%, de ovo a adulto de 26 dias e os adultos vivem em média 51 dias. Foi encontrado de quatro a cinco instares, sendo maior ocorrência de cinco instares. A oviposição ocorre próximo à nervura central das folhas, principalmente nas folhas do cartucho do milho. A eclosão das ninfas leva em média 12 dias e os cinco instares desenvolvem-se, em média, em 3 dias (WAQUIL et al., 1999). As fêmeas apresentam uma maior longevidade na fase adulta em relação aos machos (ZURITA; ANJOS; WAQUIL, 2000). Existem também evidências de que esta espécie possui grande capacidade de dispersão (OLIVEIRA et al., 2002b).

2.2.3 Processo de transmissão dos mollicutes

Os mollicutes dos enfezamentos apresentam relação de transmissão persistente propagativa (NAULT, 1980). Ao se alimentar no floema de plantas infectadas o inseto vetor ingere o fitopatógeno. Este ao chegar ao trato digestivo irá se aderir e ultrapassar a barreira do epitélio do mesêntero chegando a hemocèle (SUZUKI et al., 2006; GRAY; BANERJEE, 1999). Na hemocèle, com o fluxo da hemolinfa, o fitopatógeno circula pelo corpo do inseto alcançando e multiplicando-se em diversos órgãos, principalmente nas glândulas salivares, de onde será inoculado quando o inseto salivar no floema de plantas sadias (RASHIDI et al., 2015; GRAY; BANERJEE, 1999).

O processo de transmissão de fitopatógenos envolve processos relacionados à interação fitopatógeno-inseto-vetor. Estes processos são divididos em 4 períodos: período de acesso à aquisição, período de latência, período de acesso à inoculação e o período de retenção no vetor.

O **período de aquisição** é o período necessário para que o inseto, alimentando-se em uma planta infectada, adquira o fitopatógeno. A aquisição pode variar de poucos segundos a horas, dependendo do tipo de transmissão. Após o período de aquisição inicia-se o **período de latência**, que corresponde ao tempo que o fitopatógeno leva para circular e/ou se propagar dentro do inseto vetor e estar apto a ser inoculado. **Período de acesso à inoculação** é o período necessário para que o inseto vetor, já apto a inocular o fitopatógeno, se alimente numa planta sadia e inocule o fitopatógeno. Por fim, **período de retenção no vetor** é o tempo que o inseto permanece capaz de inocular fitopatógeno (OLIVEIRA; LOPES, 2004a).

O fitoplasma do enfezamento vermelho do milho necessita de um período mínimo de acesso à aquisição de 1 hora para adquirir o fitopatógeno, sendo o período de latência de cerca de 23 dias, dependendo da temperatura, e o período mínimo de acesso a inoculação de 2 horas (LEGRAND; POWER, 1994; MOYA-RAYGOZA; NAULT, 1998).

2.2.4 Sintomas dos enfezamentos

O enfezamento pálido do milho apresenta sintomas foliares como estrias cloróticas iniciando-se principalmente próximo à base e com direção ao ápice das folhas, redução no porte da planta devido ao encurtamento de internódios, proliferação de espigas, redução no crescimento e/ou enchimento dos grãos. O enfezamento vermelho apresenta sintomas parecidos com os do enfezamento pálido diferenciando-se apenas por apresentar intenso avermelhamento foliar ao invés de estrias cloróticas nas folhas (NAULT, 1980; OLIVEIRA; PAIVA, 2004).

Porém estes sintomas são variáveis de acordo com o clima, a suscetibilidade do híbrido e o estágio de infecção da planta, o que torna difícil distinguir claramente o enfezamento pálido do enfezamento vermelho em campo (NAULT, 1980; OLIVEIRA; PAIVA, 2004). Quando os dois mollicutes encontram-se associados na mesma planta, os sintomas apresentam-se mais parecidos com o do enfezamento vermelho (OLIVEIRA; PAIVA, 2004).

2.2.5 Sobrevivência da cigarrinha vetora e do fitoplasma na entressafra

A espécie *D. maidis* possui uma gama restrita de hospedeiros, estando praticamente limitada ao milho. Porém, na ausência desta planta, pode se alimentar em hospedeiros alternativos do gênero *Zea* e *Tripsacum*, ambos parentes próximos do milho e, assim como o milho, tem como provável centro de origem nos altos vales da região central do México (NAULT, 1983, NAULT et al., 1983).

Não existem relatos de plantas no Brasil, dos gêneros *Zea* (exceto o milho) e *Tripsacum*, ocorrendo em campos de milho, porém é relatada a ocorrência de *Tripsacum* na flora nativa das regiões norte, nordeste, centro-oeste, e do estado de São Paulo (FILGUEIRAS, 2016; LOPES; OLIVEIRA, 2004). A ausência do milho no campo após a colheita é um grande desafio à sobrevivência da população de *D.*

maidis. Para sobreviver neste período de entressafra é necessário que a população apresente uma estratégia de sobrevivência para vencer este período de ausência do hospedeiro. Basicamente existem três possíveis estratégias que a população pode utilizar durante este período: diapausa, sobrevivência em hospedeiros alternativos e migração. No entanto, nenhuma destas explicações são consideradas satisfatórias (LOPES; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA; LOPES, 2004b).

2.2.6 Efeitos dos fitoplasmas nos insetos vetores

Patógenos de plantas, que são transmitidos por insetos vetores, podem alterar o comportamento e o desempenho biológico de seu(s) vetor(es). Estas alterações podem ser de forma indireta, quando o patógeno interfere na fisiologia da planta hospedeira ou de forma direta, durante a colonização após serem adquiridos pelo vetor (FERERES; MORENO, 2009; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ et al., 2004; MCELHANY; REAL; POWER; 1995).

Entre os fitoplasmas, diversos trabalhos relatam diferentes efeitos na biologia do vetor, desde efeitos negativos a efeitos positivos. ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ afeta negativamente a fecundidade das fêmeas e a longevidade da população do seu vetor, a cigarrinha *Amplipcephalus curtulus* Linnavuori & DeLong (ARISMENDI; CARRILLO, 2015). Também são relatados efeitos negativos do ‘flavescence doreé phytoplasma’ tanto no seu vetor natural (*Scaphoideus titanus*) quanto no experimental (*Euscelidius variegatus*) (BRESSAN et al 2005; BRESSAN; GIROLAMI; BOUDON-PADIEU, 2005). O fitoplasma ‘aster yellow witch’s broom’ (AY-WB), que é transmitido pela cigarrinha vetora *Macrostelus quadrilineatus* Forbes, é capaz de aumentar a atratividade da planta infectada, a sobrevivência e a oviposição de seu inseto vetor (SUGIO et al., 2011a, 2011b).

O AY-WB também tem efeitos positivos em cigarrinhas não vetoras. Ao ser inoculado em *Arabidopsis* foi capaz de tornar esta planta um hospedeiro viável à cigarrinha *D. maidis*, o que não ocorre quando esta planta está sadia (KINGDOM; HOGENHOUT, 2007). *D. maidis* ao se alimentar em *Arabidopsis*, foi capaz de adquirir o AY-WB, porém incapaz de inocular o fitopatógeno (KINGDOM; HOGENHOUT, 2007). Com estes resultados obtidos para AY-WB pode ser possível que o MBSP seja capaz de tornar plantas daninhas hospedeiras viáveis à cigarrinha *D. maidis* na ausência do seu principal hospedeiro, o milho. O fitoplasma MBSP

também se mostrou altamente patogênico a outras espécies de cigarrinhas do gênero *Dalbulus*, também vetoras, que se alimentam no milho e competem com *D. maidis* (MADDEN; NAULT, 1983). Considerando-se que no Brasil outras espécies de cigarrinhas apresentam pequenas populações em milho (OLIVEIRA, 1996; OLIVEIRA, 2000), postula-se que este fitoplasma as afete negativamente reduzindo sua capacidade de competição com *D. maidis*.

Haas (2010) inoculou três espécies de plantas daninhas da família Poaceae com MBSP em condições de laboratório, mas não avaliou se a presença de MBSP foi capaz de tornar a planta um hospedeiro alternativo viável ao seu vetor *D. maidis*. Também não há relatos de espécies de cigarrinhas presentes na vegetação espontânea que possam eventualmente se alimentar no milho e com isso fazer a disseminação primária do patógeno e poucos são os trabalhos sobre o efeito da infecção pelo fitoplasma sobre a sobrevivência *D. maidis* na ausência de seu hospedeiro, bem como no desenvolvimento de *D. maidis* e *Agallia albidula* Uhler quando expostas a plantas infectadas.

3 METODOLOGIA

3.1 Criação de cigarrinhas livres de fitoplasma

A colônia de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) foi mantida no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP) em gaiolas teladas de alumínio, com 60x30x30 cm, seguindo método semelhante ao descrito por Oliveira e Lopes (2004a), dentro de estufa com temperatura variando entre 15 a 35°C.

Foram colocados de três a cinco vasos com três plantas saudias de milho por vaso, pertencentes ao híbrido 2B433PW-C3M com quatro folhas expandidas no interior de gaiolas para oviposição. Este híbrido de milho foi escolhido pela sua susceptibilidade ao MBSP e rápida manifestação de sintomas. Foram selecionados para a postura insetos adultos sexualmente maduros, com cinco a seis dias após a emergência do adulto (WAQUIL et al., 1999; ZURITA; ANJOS; WAQUIL, 2000). As plantas de milho foram expostas aos adultos para oviposição por um período de 3 a 7 dias, dependendo do número de insetos presentes na gaiola, quanto maior o número de insetos menor o tempo de exposição aos mesmos. Após a eclosão das ninfas de 1º instar, que ocorre em média 12 dias após a oviposição, foram adicionados novas plantas saudias de milho no estágio de 4-6 folhas expandidas, devido à alimentação das ninfas e injeção de toxinas nas plantas de milho. Após a emergência e a maturação sexual dos insetos adultos, estes foram utilizados para a montagem de novas gaiolas de postura.

A colônia não infectiva de *D. maidis* foi estabelecida usando insetos coletados em Jardinópolis, estado de São Paulo, Brasil (20.912931 S; 47.896399 O). Para o estabelecimento da colônia não infectiva seguiu-se o procedimento descrito por Oliveira e Lopes (2004a). Os insetos foram colocados em contato com plantas saudias de milho no estágio de 4-5 folhas expandidas por um período de 2 dias; aproximadamente 8 dias findo o período de oviposição, quando era possível visualizar os olhos compostos das ninfas dentro dos ovos, as folhas de milho contendo os ovos foram coletadas e com o auxílio de microscópio estereoscópico, pinça e um bisturi, os ovos foram excisados e colocados em placa de Petri contendo uma folha de papel de filtro que foi umedecida diariamente para evitar a dessecação

dos mesmos. Estes ovos foram observados diariamente e as ninfas eclodidas foram coletadas e colocadas em plantas de milho sadias no estágio quatro folhas expandidas.

3.2 Obtenção de plantas-fonte do fitoplasma do milho

O isolado de MBSP utilizado no presente estudo foi obtido de uma planta de milho com sintomas típicos de enfezamento vermelho, coletada em campo de milho no Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP (-22.7076 Latitude, -47.6366 Longitude), em 2012. O isolado, denominado R4, foi recuperado da planta doente e perpetuado em plantas de milho mantidas em casa-de-vegetação, por meio de transmissão por cigarrinhas, provenientes da colônia sadia de *D. maidis*, mantida no Laboratório de Insetos Vetores da ESALQ/USP. A seguir estão descritos os procedimentos usados para detecção e identificação do fitoplasma proveniente da planta de campo.

Extração de DNA das plantas: O DNA total das plantas de milho foi extraído usando o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany, Cat. No. 69104), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, com algumas modificações. Para isso, amostras de tecido foram coletadas das folhas de milho e maceradas em nitrogênio líquido, usando um cadinho de porcelana e um pistilo. Uma alíquota do tecido já macerado foi transferida para um novo cadinho e macerada novamente em 400 µl de solução AP1. O macerado foi coletado e transferido para microtubos de 1,5 ml nos quais foram adicionados 2 µl de RNase e 130 µl de solução AP2. A mistura foi incubada por 5 min a -20°C, então os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi coletado em uma coluna e nova centrifugação foi realizada a 13.000 rpm por 2 min. O líquido que passou pela coluna foi transferido para novo microtubo de 1,5 ml no qual foi adicionado 600 µl de tampão AP3/E e homogeneizado. A mistura foi transferida para nova coluna e centrifugada a 8000 rpm por 1 min. O líquido que passou pela coluna branca foi descartado e a coluna foi transferida para novo microtubo. O DNA retido na coluna foi lavado duas vezes com 500 µl de solução AW, centrifugado primeiramente a 8000 rpm por 1 min e uma segunda vez a 14.000 rpm por 2 min, descartando o líquido que passou pela coluna. A coluna foi transferida para novo microtubo de 1,5 ml nos quais foram adicionados

100 µl de solução de ressuspensão AE. Após 5 min na temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm por 1 min.

Deteção de MBSP nas amostras de DNA: a detecção da presença do fitoplasma nas amostras de DNA total do milho foi feita por meio de nested-PCR usando o par de primers universais R16mF2/R16mR1 (CATGCAAGTCGAACGGA/CTTAACCCCAATCATCATCGAC) na primeira reação e o par de primers R16(l)F1/R16(l)R1 (TAAAAGACCTAGCAATAGG/CAATCCGAACTGAGACTGT) para a segunda reação (GUNDERSEN; LEE, 1996; LEE et al., 1994). As reações foram preparadas usando 12,5 µl de 'PCR Master Mix (2X)' (Thermo Scientific, Cat. n° K0172), 2,5 µl de cada primer (0,5 µM) e 1 µl do DNA extraído adicionando água para completar 25 µl de solução. As plantas também foram testadas para a presença de MBSP usando os primers P1/AYint (AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT/TACAATTTGCAAGCAAGTTAC) (SMART et al., 1996).

Todas as plantas com o isolado do fitoplasma também foram testadas para a presença de *S. kunkelii* por PCR, usando o par de primers CSSF1/CSSR1 (CTGTAGCGGCAAAAGATGTA/AGTAGTTGCGGCTGAATAGTT) e amplificados nas mesmas condições descritas por Barros et al. (2001). Caso fosse detectado dupla infecção, as plantas eram descartadas.

3.3 Plantas daninhas utilizadas nos experimentos

As espécies de plantas daninhas utilizadas nos experimentos foram escolhidas por três características importantes: proximidade filogenética com o milho (*Zea mays* L.), serem hospedeiras de outras espécies de fitoplasma e de ocorrência comum em campos de milho, segundo levantamentos fitossociológicos (DUARTE; SILVA; DEUBER; 2003; JAKELAITIS et al., 2003; VAZ DE MELO et al., 2007; SÁNCHEZ-KEN; CLARK, 2010; KELLOGG et al., 2001). Assim, foram escolhidas as seguintes espécies: *Raphanus sativus* L. (nabo-forrageiro), *Urochloa decumbens* Stapf (capim-braquiária), *Solanum americanum* Mill (maria-pretinha), *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (buva), *Cenchrus echinatus* L. (capim-carrapicho), *Echinochloa colona* (L.) Link (capim-arroz), *Commelina benghalensis* Linn. (trapoeraba), *Aristida longiseta* Steud. (capim-barba-de-bode), *Panicum maximum* Jacq. (capim-colonião), *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (grama-seda). Utilizaram-se plantas na fase vegetativa obtidas via semeadura em vasos plásticos com 10 cm de

diâmetro, contendo substrato comercial marca Topstrato HT, e fertirrigadas semanalmente com macro e micronutrientes (nitrogênio, fosforo, potássio, magnésio, cálcio, enxofre, ferro, zinco e cobre).

3.4 Inoculação de plantas daninhas com o fitoplasma do milho

Neste experimento avaliou-se a capacidade de MBSP em colonizar as espécies de plantas daninhas selecionadas com base nos critérios descritos anteriormente, usando-se milho como controle.

Obtenção de insetos infectivos para inoculação de MBSP: indivíduos de 2º. e 3º. instares provenientes da colônia de *D. maidis* foram confinados sobre plantas de milho infectadas por MBSP (plantas-fonte), onde permaneceram por um período de acesso a aquisição (PAA) de 7 dias. Em seguida, os indivíduos foram transferidos para plantas de milho sadias por um período de latência (PL) de cerca de 30 dias (OLIVEIRA; LOPES, 2004b). Durante o PL as plantas de milho oferecidas às cigarrinhas foram trocadas semanalmente para evitar a eclosão das ninfas. Após o PL de 30 dias estes insetos foram então utilizados para a inoculação das plantas daninhas.

Inoculação das plantas daninhas: Ao término do PL, foram confinadas 10,15 ou 20 cigarrinhas infectivas por planta sadia (planta-teste) para evitar o excesso de cigarrinhas e a competição entre elas. O número de cigarrinhas foi proporcional à área foliar das plantulas. O período de acesso a inoculação (PAI) foi de 4 dias. Para confinamento dos insetos, as plantas foram encobertas por gaiolas cilíndricas com diâmetro de 10 cm, feitas com folha de acetato tamanho 'A4', contendo aberturas circulares revestidas de tecido poroso ('voile') no topo e na lateral do tubo, para fins de ventilação. Foram utilizadas de 25 a 30 plantas de cada espécie para a inoculação, sendo cinco destas plantas inoculadas com insetos não infectivos (controle negativo), para a certificação de que os lotes de plantas não estavam previamente infectados com o fitoplasma. Em cada data de inoculação de plantas daninhas, também foram inoculadas 10 plantas de milho sadias com cigarrinhas infectivas (controle positivo) e cinco com cigarrinhas provenientes da criação de laboratório, que foram utilizadas como controle negativo para certificar que as cigarrinhas da colônia não estavam previamente infectadas por fitoplasma. Como planta-teste de milho, utilizou-se o híbrido 2B433PW-C3M, que é susceptível e

demonstra sintomas rapidamente (cerca de 30 dias), no estágio de 2 folhas expandidas.

Durante o PAA, PL e PAI, todas as plantas-teste contendo os insetos foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Ao término do PAI, avaliaram-se o número de cigarrinhas sobreviventes nas plantas e, após 5 dias, examinaram-se as plantas quanto à presença de ovos. Em seguida todas as plantas-teste foram pulverizadas com inseticida piretróide e mantidas em telados livres de cigarrinhas.

Cerca de 60 dias após a inoculação, as plantas de milho foram avaliadas quanto à presença de sintomas de MBSP. No caso das plantas daninhas, foram coletadas amostras foliares para detecção de MBSP por 'polymerase chain reaction' (PCR).

Extração de DNA: As amostras foliares foram submetidas à extração de DNA pelo método de CTAB, conforme procedimentos descritos por Doyle e Doyle (1987). Para isso, amostras de tecido foram coletadas das folhas das diversas espécies de plantas inoculadas e maceradas em nitrogênio líquido, usando cadinhos de porcelana e pistilos. Uma alíquota do tecido já macerada foi transferida para microtubo de 2 ml onde foram adicionados 800 µl de tampão de extração (2 g CTAB, 8,18 g NaCl, 0,74 g EDTA, 1,5 g Tris HCL, 100 ml de água, pH 8,0) e submetidos à agitação vigorosa por 5 min em Tissuelyser LT (Quiagen). Logo após, as amostras foram incubadas à temperatura de 65°C por 60 min e agitadas a cada 10 min para homogeneizar a suspensão. Após o período de incubação de 60 min foram adicionados 600 µl de CIA (24 partes de clorofórmio para 1 parte de álcool isoamílico) e a mistura foi agitada até tornar-se uma emulsão, que foi centrifugada a 14.000 rpm, durante 10 min. Os tubos foram retirados da centrifuga e 400 µl da fase superior aquosa foi removida com micropipeta e transferida para novo microtubo de 1,5 ml e adicionados 400 µl de isopropanol à temperatura de -20°C . O material foi levado a -20°C e após 24 h foi submetido à centrifugação a 14.000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi descartado permanecendo o precipitado no fundo do tubo. Este precipitado foi lavado adicionando-se 1 ml de etanol 80% e deixando-se por um período de 10 min em contato com o precipitado. Após a lavagem com etanol, adicionou-se 500 µl de NaCl 1M e armazenou-se em temperatura de 4°C por 60 min, e uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 min foi realizada, sendo descartado o

sobrenadante. Nova lavagem com etanol 80% durante 10 min foi realizada, descartado o etanol 80% e o precipitado deixado a temperatura ambiente para secagem. Posteriormente o precipitado foi ressuspensionado em 50 µl de água deionizada (Milli-Q), como foi mantido o extrato de DNA.

Deteção por PCR: Após a extração de DNA, alíquotas foram submetidas a testes de nested-PCR conforme procedimentos descritos por Gundersen e Lee, (1996) e Lee et al. (1994), utilizando-se os primers R16mF2/R16mR1 (CATGCAAGTCGAACGGA /CTTAACCCCAATCATCATCGAC) para a primeira reação e os primers R16(I)F1/R16(I)R1 (TAAAAGACCTAGCAATAGG/CAATCCGAACTGAGACTGT) para a segunda reação. A reação de PCR foi preparada misturando-se os seguintes reagentes: 2,5 µl de solução de PBR 10X (1X), 0,75 µl de 50 mM MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µl de dNTP (0,2 mM), 1,25 µl de cada primer (0,5 mM) e 1 U/ µl de Taq DNA polymerase, 1 µl da amostra DNA, e por último foi adicionado água para completar 25 µl por amostra. O produto da primeira reação de PCR foi diluído (1:20) e usado como amostra de DNA para a segunda reação de PCR. As reações foram realizadas com as seguintes configurações: 94°C por 2 min para a desnaturação do DNA e, então, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s. A temperatura para anelamento foi de 55°C por 30 s e de extensão 72°C por 90 s, mais uma extensão final de 72°C por 5 min.

Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio, usando marcador 1kb sob transiluminador Stratagene® UV light Box.

3.5 Transmissão de MBSP por espécies de cigarrinhas presentes na vegetação espontânea.

Entre os cicadelídeos (Hemiptera: Cicadellidae) relatados em cultivos de milho (LOPES; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2013), duas espécies foram escolhidas para o experimento de transmissão: *Agallia albidula* Uhler e *Planicephalus flavicosta* (Stål), pertencentes às subfamílias Agalliinae e Deltocephalinae, respectivamente. Essas espécies foram selecionadas pelos diferentes níveis de proximidade filogenética com *D. maidis* (subfamília Deltocephalinae), que é o único vetor de MBSP relatado no Brasil, e ocorrência na

vegetação espontânea dos campos de produção de milho (OLIVEIRA, 1996, 2000; OLIVEIRA et al., 2013; TRIPLEHORN; NAULT, 1985).

Coleta e estabelecimento das colônias: Para as duas espécies escolhidas para os experimentos de transmissão, *A. albidula* e *P. flavicosta*, foram estabelecidas criações de laboratório em milho. Estas duas espécies foram coletadas em campos de milho sucedido por brássicas, em Araçoiaba da Serra (SP), com rede de varredura e armazenadas em gaiolas contendo milho e braquiária para posterior triagem em laboratório.

No laboratório, com o auxílio de um sugador entomológico e câmara de transferência de insetos, aproximadamente dez cigarrinhas por vez foram colocadas em uma placa de Petri em contato com gelo por alguns segundos até atingirem o estado de dormência e, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, foi feita a separação cuidadosa das espécies. Após a separação, 80-100 adultos de cada uma das espécies escolhidas foram colocados em gaiolas separadas contendo um vaso de capim-braquiária e três vasos de milho (plantas produzidas em casa de vegetação com tela anti-afídica, livre da presença de cigarrinhas) por um período de 7 dias para oviposição. Após este período, as plantas foram transferidas para novas gaiolas e posteriormente avaliadas quanto à presença de ninfas. Cerca de 7 dias após a emergência dos adultos, estes foram utilizados para a realização de novas posturas. Quando a população de ambas as espécies atingiu cerca de 500 adultos por gaiola, parte destes adultos (aproximadamente 250) foram utilizados para a postura apenas em milho. Desta forma foram estabelecidas colônias das duas espécies em plantas de milho.

Para a multiplicação dessas cigarrinhas, adotaram-se procedimentos, plantas e gaiolas semelhantes aos que foram descritos para a criação de *D. maidis* (item 3.1). Para oviposição, confinaram-se cerca de 500 adultos com 5 dias após a emergência (considera-se que nesse período já tenham atingido a maturidade sexual) sobre quatro a seis vasos com plantas de milho no estágio de três a quatro folhas expandidas. As plantas de milho foram deixadas em contato com os adultos para oviposição por um período de 7 dias. A substituição das plantas na gaiola não foi feita, pois a alimentação de ambas as espécies não debilita a planta como acontece com a alimentação de *D. maidis*; apenas foi adicionado sulfato de amônio ao vaso das plantas para evitar o amarelecimento das mesmas. Após a emergência

e a maturação sexual dos insetos adultos, estes foram utilizados para a montagem de uma nova gaiola de postura.

Experimento de transmissão com insetos da criação do laboratório: Cerca de 300 ninfas de 3º a 4º instar de *A. albidula*, *P. flavicosta* e *D. maidis* (espécie controle) foram submetidas a um PAA de 7 dias numa mesma planta-fonte de MBSP com sintomas severos de enfezamento vermelho. Após esse período, as cigarrinhas foram mantidas em plantas de milho sadias por um PL de 7 dias em casa-de-vegetação com temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), sendo então transferidas para sucessivos PAIs de 5 dias em plantas sadias de milho no estágio de duas folhas expandidas. Utilizou-se gaiolas cilíndricas com diâmetro de 10 cm para confinamento dos insetos sobre as plantas-teste. Estas gaiolas foram feitas com folha de acetato tamanho 'A4', contendo aberturas circulares revestidas de tecido poroso ('voile') no topo e na lateral do tubo, para fins de ventilação. Foram inoculadas 20 plantas-teste para cada espécie de cigarrinhas em cada PAI, usando-se cinco insetos por planta-teste para *A. albidula* e *P. flavicosta*, e apenas três insetos para a espécie controle *D. maidis*. Destas 20 plantas-teste, cinco foram utilizadas como controle negativo, as quais foram expostas apenas a insetos das colônias não infectivas. Quando ocorreu uma eventual morte de insetos durante o PAI, estes foram substituídos por insetos remanescentes que foram mantidos em milho sadio após o PAA. Ao término do experimento, as cigarrinhas usadas nos PAIs foram armazenados em microtubos contendo álcool 70% e mantidas em freezer a temperatura de -20°C para posterior detecção de MBSP por PCR.

Durante o PAA, PL e PAIs, as plantas-teste e os insetos foram mantidos em casa-de-vegetação com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Após o PAI, as plantas-teste foram pulverizadas com inseticida piretróide e mantidas em telado livre de cigarrinhas por 60 dias, quando foi realizada a avaliação de sintomas.

Extração de DNA de cigarrinhas e PCR para detecção de MBSP: O DNA total das cigarrinhas foi extraído seguindo-se o método proposto por Miller et. al (1997), com os seguintes procedimentos: dois insetos foram colocados em tubo de 500 µl, foi adicionados 10 µl de NaOH 1M por tubo. Os insetos foram macerados com uma pipeta de Pasteur. Imediatamente após a maceração foram adicionados 30 µl de tampão Tris – HCL (SDS 0,1% e EDTA 20mM) e a amostra foi homogeneizada. Os tubos foram colocados em banho-maria a 65°C por 15 min. Após o banho-maria os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 min. Um volume de 30 µl do

sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 500 µl e adicionado etanol 90%, homogeneizado e colocado em temperatura de -20°C por 30 min. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram deixados para a secagem à temperatura ambiente, e então foram adicionados 30 µl de tampão TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA). O PCR foi realizado conforme a metodologia descrita no item 3.4, utilizando-se os primers R16mF2/R16mR1 para a primeira reação e os primers R16(I)F1/R16(I)R1 para a segunda reação. (GUNDERSEN; LEE, 1996; LEE et al., 1994).

3.6 Avaliação da sobrevivência de *D. maidis* em plantas daninhas.

Neste experimento avaliou-se a sobrevivência de cigarrinhas infectivas e não infectivas em plantas daninhas recorrentes em campos de milho.

Inicialmente foi realizado um teste preliminar com as dez espécies de plantas daninhas escolhidas, para selecionar duas espécies com níveis contrastantes de sobrevivência de *D. maidis* em relação ao milho. Posteriormente as duas espécies escolhidas foram utilizadas no experimento de sobrevivência com cigarrinhas não-infectivas vs. infectivas.

Experimento preliminar de sobrevivência com casais não infectivos: A avaliação preliminar das espécies foi feita em dois ensaios. O primeiro foi realizado com as espécies Maria-pretinha, Braquiária, Capim-carrapicho, Buva e Capim-arroz, e o segundo com as espécies Nabo-forrageiro, Capim-colonião, Grama-seda, Trapoeraba e Capim-barba-de-bode.

Nesses ensaios preliminares foram utilizadas cinco plantas para cada espécie de planta daninha e confinados cinco casais de *D. maidis* por planta. Como controle utilizaram-se cinco plantas de milho. Para a formação dos casais, cigarrinhas com cerca de cinco dias após a emergência foram anestesiadas por meio de CO₂ para observação da genitália sob microscópio estereoscópico e sexagem. Para a anestesia, 10 insetos por vez foram sugados para o interior de um aspirador entomológico, que foi acoplado a uma bomba de CO₂, para introdução do gás. Os insetos foram mantidos sob ação de CO₂ por 15 a 30 s até entrarem em estado de dormência, sendo em seguida retirados do aspirador e analisados sob o microscópio estereoscópico. Ao fim da sexagem, os casais foram mantidos por 24 h em plantas de milho sadias, no estágio de quatro folhas expandidas, antes do início do

experimento. A sobrevivência de machos e fêmeas de *D. maidis* sobre plantas das diferentes espécies vegetais foi avaliada diariamente no primeiro experimento e a cada 3 dias no segundo experimento, por um período máximo de 25 dias. O experimento foi mantido em casa-de-vegetação com temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).

Experimento de sobrevivência com insetos infectivos e não infectivos: Para a produção dos insetos infectivos e não infectivos usados no experimento, plantas de milho infectadas assintomáticas e sadias, com 5 a 6 folhas expandidas, foram submetidas, separadamente, a 2 dias de postura por adultos não infectivos de *D. maidis*, com aproximadamente 10 dias após a emergência. Estas plantas foram colocadas em gaiolas teladas de alumínio de 90x30x30 cm, e mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Após a eclosão dos ovos, quando as plantas infectadas apresentavam os sintomas do MBSP, estas foram substituídas por plantas inoculadas com MBSP, jovens e assintomáticas; o mesmo procedimento foi adotado para a produção de insetos não infectivos, com a diferença que apenas plantas sadias foram utilizadas. As plantas de milho infectadas e sadias utilizadas para a postura de *D. maidis* e manutenção destes lotes de insetos foram obtidas submetendo-se sucessivamente lotes de plantas de milho com duas folhas expandidas a um PAI de 3 dias com 10 insetos infectivos por planta, para a produção das plantas infectadas e 10 insetos não infectivos, para a obtenção das plantas não infectadas. Após o PAI, esperou-se a eclosão das ninfas provenientes dos ovos dos insetos do PAI e estas foram retiradas manualmente e descartadas, sem utilização de inseticidas.

Os insetos infectivos e não infectivos produzidos para o experimento foram sexados no quinto dia após a emergência, utilizando-se anestesia com baixa temperatura (“método do gelo”). Dez insetos por vez foram colocados em uma placa de Petri em contato com gelo por 2-3 min, ficando desta forma em estado de dormência, tornando possível a visualização da genitália e a sexagem sob estereoscópio. Em seguida, os machos e fêmeas foram mantidos isoladamente por 24 h em plantas de milho não infectadas, no estágio de quatro folhas expandidas, antes do início do experimento.

Neste experimento foram utilizadas duas das 10 espécies de plantas daninhas avaliadas no experimento preliminar de sobrevivência, Maria-pretinha e Braquiária, além de Milho (controle). Cada espécie vegetal foi exposta a indivíduos

não infectivos e infectivos, machos e fêmeas separadamente, confinando-se 10 indivíduos por planta, por meio de gaiolas feitas com tecido poroso 'voile'. O experimento foi inteiramente casualizado, com cinco plantas (repetições) por tratamento (espécie vegetal, sexo e infecção dos insetos por MBSP).

Os indivíduos sobreviventes foram contados a cada dois dias durante um período de 27 dias. As plantas foram substituídas a cada 10 dias para evitar o possível efeito indireto resultante colonização e alteração da fisiologia da planta pelo fitoplasma. Após a substituição das plantas no décimo dia do experimento, as mesmas foram pulverizadas com inseticida piretróide (Lambda-cialotrina) e armazenadas em casa-de-vegetação para avaliação de sintomas e confirmação da presença e ausência do fitoplasma nos lotes de insetos infectivos e não infectivos. As curvas de sobrevivência obtidas foram comparadas pelo teste estatístico LogRank.

3.7 Efeito da infecção de plantas de milho por MBSP sobre a oviposição e sobrevivência de imaturos de *D. maidis* e *A. albidula*

Como o fitoplasma do milho afeta negativamente outras espécies de cigarrinhas do gênero *Dalbulus* que ocorrem no México (MADDEN et al., 1984), investigou-se neste experimento o efeito indireto da infecção de MBSP em plantas de milho na oviposição e sobrevivência de ninfas da cigarrinha vetora, *D. maidis* e de uma espécie não vetora, *A. albidula*, que é comum em vegetação rasteira de cultivos de milho do Estado de São Paulo (LOPES; OLIVEIRA, 2004). Para tal, avaliou-se a oviposição por adultos e sobrevivência da progênie das duas espécies de cigarrinhas em plantas de milho infectadas e não infectadas com o fitoplasma.

Submeteram-se plântulas de milho no estágio de duas folhas expandidas a um PAI de 2 dias, com 10 adultos infectivos de *D. maidis* por planta, para obtenção das plantas infectadas e dez adultos não infectivos por planta, para produção de plantas não infectadas. Em seguida esperou-se a eclosão das ninfas provenientes dos ovos dos insetos usados no PAI, e estas foram retiradas manualmente e descartadas, sem utilização de inseticidas. Os insetos infectivos utilizados para inoculação destas plantas foram obtidos colocando-os por um PAA de 7 dias em plantas de milho sintomáticas, iniciado com ninfas de 3º e 4º instares. Após o PAA, estes indivíduos foram mantidos em plantas saudáveis de milho em casa-de-vegetação

com temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) por período de latência de 30 dias; as plantas utilizadas na alimentação destes insetos durante a latência foram substituídas semanalmente para evitar a eclosão dos ovos. Após a remoção das ninfas provenientes dos ovos dos insetos do PAI, estas plantas não-infectadas e infectadas foram utilizadas no experimento.

Três casais por planta de cigarrinhas não-infectivas das espécies *D. maidis* e *A. albidula* foram confinados separadamente por dois dias em plantas infectadas assintomáticas e não-infectadas com 16 dias após o PAI, foram utilizada seis repetições para cada tratamento. Neste experimento os adultos da espécie *A. albidula* foram coletados em campo, sobre plantas de Maria-pretinha em Piracicaba, SP, e os de *D. maidis* foram obtidas na criação do laboratório (item 3.1). Para a certificação de que os adultos da espécie *A. albidula* não estavam infectivos, após o período de oviposição os três casais de cada repetição foram submetidos a um PAI de 3 dias em plantas-teste de milho; após o PAI as plantas-teste foram pulverizadas e mantidas em casa-de-vegetação com tela anti-afidica, avaliando-se posteriormente, a presença de sintomas de infecção por fitoplasma ou vírus.

Cinco dias após a saída dos insetos do período de postura contou-se o número de ovos das cigarrinhas sob microscópio estereoscópico. Posteriormente avaliou-se o número de ninfas de 1°. instar eclodidas, o número de adultos emergidos e a razão sexual. Os dados referentes ao número de ovos, ninfas de 1°. instar eclodidas e adultos emergidos, como são dados obtidos por meio de contagens, ou seja, são variáveis aleatórias quantitativas discretas, foram avaliados estatisticamente por meio da análise GLM de Poisson, e os dados de razão sexual por serem uma proporção e também dados quantitativos discretos foram avaliados pela análise GLM Binomial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculação de plantas daninhas com o ‘maize bushy stunt phytoplasma’ (MBSP)

Das dez espécies de plantas daninhas inoculadas em nenhuma foi possível a detecção do fitoplasma do milho, ‘maize bushy stunt phytoplasma’ (MBSP), por PCR convencional, nem mesmo por nested-PCR, que possui maior sensibilidade a baixas quantidades de DNA (Tabela 1). Também não foi observada a oviposição nestas plantas, com exceção do milho que é o hospedeiro primário da cigarrinha *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott).

A sobrevivência de *D. maidis* durante o PAI em plantas daninhas ficou abaixo de 10% para insetos infectivos, com exceção da espécie Capim barba-de-bode. (30,3%), enquanto que a sobrevivência para insetos não infectivos, em geral, foi um pouco maior que a de insetos infectivos, especialmente nas plantas Maria-pretinha (37%), Capim barba-de-bode (22,7%), Nabo-forrageiro (20%). Para as demais plantas daninhas a sobrevivência foi próxima ou abaixo de 10%, mesmo para insetos não infectivos (Tabela 1; Figuras 1 e 2). Em milho a sobrevivência durante o PAI foi elevada ($\geq 57\%$), não havendo diferença estatística entre insetos infectivos e não infectivos, com exceção dos experimentos I e IV, em que os infectivos sobreviveram menos (57,0 e 80%, respectivamente) (Tabela 1; Figura 1).

Em muitos casos, a gama de hospedeiros do vetor, mais do que a especificidade do fitoplasma, é que limita o número de espécies de plantas que o fitoplasma pode explorar naturalmente (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). Vários hospedeiros experimentais são relatados para diferentes fitoplasmas. Os fitoplasmas ‘Aster Yellows Witches Broom’ (AYWB) e ‘Western X’ possuem naturalmente uma ampla gama de vetores e hospedeiros naturais, sendo que para esses fitoplasmas já foram relatados vetores e plantas hospedeiras experimentais (BOSCO et al., 1997, WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). O ‘flavescence dorée phytoplasma’ é bem mais específico que AYWB e ‘Western X’, colonizando naturalmente apenas algumas espécies de plantas do gênero *Vitis*. É transmitido apenas pela cigarrinha *Scaphoideus titanus* Ball, porém experimentalmente também é capaz de colonizar espécies de plantas de outros gêneros, inclusive com maior título bacteriano quando

comparado ao seu hospedeiro natural e com maior eficiência de aquisição pelo inseto vetor (MAIXNER; REINERT; DARIMONT, 2000; BRESSAN et al., 2005).

Os vetores do fitoplasma do milho são restritos ao gênero *Dalbulus*; apenas uma espécie vetora é conhecida fora deste gênero, *Baldulus tripsaci* Kramer & Whitcomb (LOPES; OLIVEIRA, 2004; MADDEN; NAULT, 1983; EBBERT et al., 2001). Apesar de existirem várias espécies de *Dalbulus* que são vetoras, o fitoplasma é altamente patogênico a maioria dessas espécies, sendo levemente patogênico à espécie *D. maidis* e não apresentando efeitos negativos apenas às espécies *D. eliminatus* (Ball) e *D. gelbus* DeLong (MADDEN et al., 1984; MADDEN; NAULT, 1983). As principais espécies vetoras no México, *D. maidis* e *D. eliminatus*, exploram uma pequena gama de plantas hospedeiras, incluindo o milho (hospedeiro primário) e os teosintos, que pertencem ao mesmo gênero do milho (*Zea*), além da espécie aparentada *Tripsacum dactyloides* (L.) que é apenas um hospedeiro alimentar alternativo (PITRE, 1967; NAULT, 1983).

Desta forma, o fitoplasma do milho é exposto naturalmente a uma gama muito restrita de plantas (PITRE, 1967; NAULT, 1983), o que explicaria a não colonização de nenhuma das diversas plantas daninhas após inoculação experimental por *D. maidis* no presente estudo. Entretanto, um estudo anterior indicou a presença de MBSP por PCR em plantas de Braquiária, Capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea* (Link) Hitch.) e Capim-colonião, após inoculação experimental com *D. maidis*, embora nenhum sintoma tenha sido observado nas mesmas (Haas, 2010). Talvez o uso de diferentes isolados de MBSP explique a diferença nos resultados de infecção dessas plantas nos dois estudos.

Deve-se salientar que diferentes isolados do mesmo fitoplasma podem ter comportamentos biológicos distintos. O isolado 'Bolt' de AYWB foi capaz de aumentar a fecundidade da cigarrinha vetora *Macrostelus quadrilineatus* Forbes, o que não ocorreu com o isolado 'Severe' do mesmo fitoplasma (BEANLAND et al., 2000). Alguns trabalhos também relatam diferentes concentrações bacterianas em planta entre isolados do mesmo fitoplasma e graus variáveis de virulência em uma mesma espécie de planta hospedeira (KUSKE; KIRKPATRIC, 1992; SINCLAIR; GRIFFITHS, 2000).

Muitos fitoplasmas apresentam variabilidade genética, mas para o fitoplasma do milho poucos trabalhos de caracterização genética de isolados foram realizados. Gomes et al. (2004), utilizando a técnica de RFLP, não encontraram variabilidade

genética entre isolados de MBSP coletados nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Avaliando-se a variabilidade de uma proteína efetora de MBSP homóloga à proteína SAP11 de AYWB, que são hipoteticamente responsáveis em parte pela colonização das plantas hospedeiras e desempenho do fitoplasma. Observou-se que a região que codifica SAP11 de MBSP possui sequências extremamente similares entre diversos isolados, que não refletem alterações de aminoácidos na proteína efetora (CANALE et al., 2014; CANALE, Dados não publicados¹).

¹Informação fornecida por Canale em Piracicaba, em 2015.

Figura 1 - Sobrevivência (%) média ($\pm$ EPM) de adultos de *D. maidis* após 4 dias de acesso à inoculação de fitoplasma em diferentes espécies de plantas daninhas e milho. Letras diferentes sobre as colunas representam diferença estatística significativa entre insetos infectivos e não infectivos (maiúscula), ou entre espécies vegetais (minúscula), pela análise glm Binomial ($p < 0,05$)

Tabela 1 – Detecção de ‘maize bushy stunt phytoplasma’ (MBSP) após 60 dias da inoculação em diferentes espécies vegetais, e sobrevivência de adultos de *Dalbulus maidis* durante o período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias ($p<0,05$)

Experimento	Espécie Vegetal	Proporção de plantas Infectadas ^a		Sobrevivência (%) das cigarrinhas durante o PAI ^d		Nº Insetos/Planta ^b
		Inoculadas ^b	Controle Negativo ^c	Infectivas	Não infectivas	
I	Milho	9/10	0/5	57,0 ± 7,2 Ba	90,0 ± 6,3 Aa	10
	Braquiária	0/20	0/5	0,0 ± 0,0 Bb	11,0 ± 4,8 Ab	20
II	Milho	9/10	0/5	93,0 ± 3,0 Aa	94,0 ± 4,0 Aa	10
	Maria-pretinha	0/23	0/5	8,8 ± 2,3 Bb	37,0 ± 8,0 Ab	20
III	Milho	8/10	0/5	88,0 ± 2,9 Aa	94,0 ± 6,0 Aa	10
	Nabo-forrageiro	0/22	0/5	0,3 ± 0,3 Bb	20,0 ± 3,5 Ab	20
IV	Milho	8/10	0/5	80,0 ± 4,7 Ba	98,0 ± 2,0 Aa	10
	Capim-arroz	0/20	0/5	0,0 ± 0,0 Bb	6,7 ± 3,0 Ab	15
	Capim-carrapicho	0/20	0/5	0,0 ± 0,0 Bb	4,0 ± 2,4 Ab	10
V	Milho	9/10	0/5	93,0 ± 3,3 Aa	92,0 ± 4,9 Aa	10
	Buva	0/20	0/5	0,3 ± 0,3 Bb	8,0 ± 5,3 Ab	15
	Gramma-seda	0/20	0/5	0,3 ± 0,3 Bb	12,0 ± 2,5 Ab	15
VI	Milho	10/10	0/5	96,0 ± 2,7 Aa	100,0 ± 0,0 Aa	10
	Capim-colonião	0/19	0/5	0,5 ± 0,3 Ab	0,0 ± 0,0 Ab	20
	Trapoeiraba	0/20	0/5	0,0 ± 0,0 Ab	0,0 ± 0,0 Ab	15
VII	Milho	9/10	0/5	100,0 ± 0,0 Aa	100,0 ± 0,0 Aa	10
	Capim-barba-de-bode	0/20	0/5	30,3 ± 3,1 Ab	22,7 ± 9,1 Ab	15

^a A infecção das plantas daninhas por MBSP foi determinada por PCR; plantas de Milho foram avaliadas apenas por sintomas.

^b Cada planta-teste foi inoculada por um grupo de 10, 15 ou 20 cigarrinhas, dependendo da espécie vegetal, que foram submetidas previamente a um período de acesso à aquisição de 7 dias em plantas-fonte de MBSP.

^c Controle negativo: plantas expostas a insetos não infectivos.

^d Médias (± EPM) seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Binomial ($p<0,05$). Não foi observada a presença de ovos de *D. maidis* nas espécies inoculadas, com exceção do milho

Figura 2 - Sobrevivência (%) média ($\pm$ EPM) de adultos de *D. maidis* após 4 dias de acesso à inoculação de fitoplasma em diferentes espécies de plantas daninhas e milho. Letras diferentes sobre as colunas representam diferença estatística significativa entre insetos infectivos e não infectivos (maiúscula), ou entre espécies vegetais (minúscula), pela análise glm Binomial ($p < 0,05$)

4.2 Avaliação da sobrevivência de *D. maidis* em plantas daninhas.

Experimento preliminar de sobrevivência com casais não infectivos: No primeiro ensaio, as plantas daninhas Capim-arroz, Capim-carrapicho e Buva não diferiram estatisticamente entre si, sendo que a mortalidade de *D. maidis* sobre as mesmas atingiu 100% no décimo quarto dia de avaliação (Figura 3A). Maria-pretinha e Braquiária diferiram estatisticamente de todas as outras espécies (Tabela 2), sendo que a primeira proporcionou maior sobrevivência de *D. maidis* (Figura 3A). No segundo ensaio, Capim-colonião e Capim-barba-de-bode não diferiram estatisticamente de nenhuma outra espécie quanto à sobrevivência de *D. maidis*, com exceção do milho. As espécies Nabo-forrageiro e Trapoeraba diferiram de Grama-seda, mas não houve diferença estatística significativa entre elas (Figura 3B, Tabela 3).

Das plantas daninhas avaliadas, Maria-pretinha foi a que apresentou melhor capacidade de manter a população de *D. maidis* viva, observando-se cerca de 25% de sobrevivência após 25 dias de exposição a esta espécie vegetal, seguida da Braquiária, na qual houve 4% de sobreviventes no mesmo período (Tabela 3A). Entre as demais espécies de plantas avaliadas, houve um rápido declínio na sobrevivência de *D. maidis*, que foi inferior a 2%, com 14 dias de exposição (Figuras 3A e 3B, Tabelas 2 e 3).

Experimento de sobrevivência com insetos infectivos e não infectivos: No geral a infecção pelo fitoplasma do milho reduziu a sobrevivência da população de *D. maidis*. Tanto os machos quanto as fêmeas foram afetados negativamente, sendo que os machos apresentaram uma queda na curva de sobrevivência mais acentuada que as fêmeas. Todos os machos infectivos expostos às duas espécies de plantas daninhas estavam mortos ao décimo nono dia do experimento, enquanto que ao término do experimento, no vigésimo sétimo dia, restavam ainda 6% de fêmeas vivas sobre Braquiária e 10% sobre Maria-pretinha (Figura 4).

As curvas de sobrevivência de machos não infectivos nas três espécies de plantas diferiram estatisticamente entre si, bem como as curvas para machos infectivos e fêmeas não infectivas. Para fêmeas infectivas, a comparação entre as curvas obtidas em Braquiária e Maria-pretinha não diferiram estatisticamente (Tabela 4).

Figura 3 - Porcentagem de sobrevivência de adultos não infectivos de *D. maidis* confinados sobre plantas sadias de diferentes espécies de daninhas e milho.

Figura 4 - Porcentagem de indivíduos sobreviventes de *Dalbulus maidis* não infectivos e infectivos com o fitoplasma do milho, sobre plantas sadias de Maria-pretinha (MP), Braquiária (Braq). (A) Machos; (B) Fêmeas e (C) Casais

Quando a comparação das curvas foi realizada entre machos e fêmeas não infectivos não foi encontrada diferença estatística nas três espécies de plantas. Porém quando a comparação entre os sexos foi feita com insetos infectivos, apenas as curvas obtidas no milho não diferiram estatisticamente entre si; nas plantas daninhas Maria-pretinha e Braquiária, a sobrevivência dos machos infectivos foi afetada mais drasticamente que a das fêmeas infectivas (Tabela 4).

Na literatura são relatadas diferentes relações dos fitoplasmas com seus insetos vetores, com trabalhos relatando efeitos negativos, neutros e positivos no desempenho biológico dos vetores (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). A cigarrinha *Amplipcephalus curtulus* Linnavuori & DeLong tem sua sobrevivência e longevidade reduzida em cerca de três a quatro semanas quando exposta a '*Candidatus* Phytoplasma ulmi'; esse efeito é mais severo nas fêmeas, além de reduzir a fecundidade das mesmas (ARISMENDI; CARRILLO, 2015). O fitoplasma associado à doença flavescence dorée em videira possui apenas uma espécie conhecida como vetora natural. Apesar de específico, esse fitoplasma reduz a sobrevivência de seu vetor *S. titanus*, bem como de seu vetor experimental *Euscelidius variegatus* (Kirschbaum). Neste último é mais afetada a longevidade dos machos quando comparada as fêmeas (BRESSAN et al 2005; BRESSAN; GIROLAMI; BOUDON-PADIEU, 2005). *Cacopsylla melanoneura* (Förster), vetor de '*Candidatus* Phytoplasma mali' que infecta macieiras e causa superbrotamento, teve sua fecundidade alterada pelo referido fitoplasma, mas não a longevidade; porém, neste trabalho os insetos foram mantidos em plantas infectadas com o fitoplasma por toda a vida, o que torna impossível a separação dos efeitos diretos e indiretos do fitoplasma (MALAGNINI et al., 2010). Beanland et al. (2000), trabalhando com dois isolados de 'Aster yellows phytoplasma', observaram que os isolados 'Bolt' e 'Severe' beneficiam o vetor *M. quadrilineatus* aumentando a longevidade, o isolado 'Bolt' ainda foi capaz de aumentar a fecundidade desta cigarrinha.

Para a cigarrinha-do-milho *D. maidis*, que é considerada monófaga, foi relatada sobrevivência em plantas de *Callistephus chinensis* infectadas com o 'Aster yellows phytoplasma' e, após a aquisição desse fitoplasma, os insetos mostraram-se também capazes de sobreviver em plantas não infectadas de *C. chinensis* (apesar de não ser capaz de inocular o patógeno), o que não ocorreu com adultos não infectados de *D. maidis* quando expostos diretamente a plantas não infectadas dessa espécie vegetal (PURCELL, 1988; MARAMOROSCH, 1958).

Com relação ao efeito da infecção pelo fitoplasma do milho (MBSP), diversos estudos relatam uma leve redução na sobrevivência da população de *D. maidis*, não sendo patogênico às espécies vetoras *D. gelbus* e *D. eliminatus*. Porém, este fitoplasma aumentou a sobrevivência da população de *D. maidis* quando exposta a baixas temperaturas (15°C) (MOYA-RAYGOZA; NAULT, 1998; MADDEN; NAULT, 1983; MADDEN et al., 1984b). No México, o MBSP é predominante em regiões elevadas onde a temperatura é mais baixa; assim, a redução na sobrevivência de *D. maidis* quando exposta ao MBSP em temperaturas mais elevadas pode estar relacionada ao fato de que esses dois organismos co-evoluíram em temperaturas mais baixas no México (NAULT, 1983a). Purcell (1982) postula que quanto maior o tempo de co-evolução entre um patógeno e seu vetor, menos deletéria se torna a relação entre eles, podendo tornar-se até mesmo benéfica. Entretanto, é possível também que o processo de seleção natural atue para maximizar a transmissão, ao invés de tornar a relação patógeno-vetor menos deletéria (DENNEHY, 2014).

Larsen; Nault; Moya-Raygoza (1992), trabalhando com populações de *D. maidis* não infectivas, observaram que cigarrinhas criadas em condições que simulavam o final da estação chuvosa no México (plantas de milho pendoadas, com estresse hídrico e sob temperaturas mais baixas), mostraram maior sobrevivência e longevidade. A população de *D. maidis* criada nessas condições ambientais foi capaz de sobreviver até 63 dias, dispondo apenas de água para alimentação. Assim, a condição fisiológica da planta hospedeira pode ter um papel fundamental como indicativo de perda do hospedeiro primário, preparando a população do inseto para um período com ausência do hospedeiro.

No experimento de sobrevivência do presente trabalho, os insetos foram criados em plantas jovens com cerca de 35 dias no máximo, quando ocorrem o aparecimento dos sintomas do fitoplasma do milho, e foram mantidas em temperaturas relativamente elevadas ($25 \pm 5^\circ\text{C}$). Dada a capacidade de sobrevivência de *D. maidis* em condições do fim do período chuvoso no México (LARSEN; NAULT; MOYA-RAYGOSA, 1992), é possível que a população desta cigarrinha passe o período de entressafra alimentando-se em plantas hospedeiras secundárias e possivelmente possa ser auxiliada na sua sobrevivência pelo fitoplasma do milho, quando em temperaturas mais baixas. Assim, sugere-se que novos estudos de sobrevivência de *D. maidis* com ou sem o fitoplasma sejam

realizados em condições de temperatura que representem o período de entressafra do milho no Brasil.

Tabela 2 – Valores de p obtidos na comparação de curvas de sobrevivência de *D. maidis* entre diferentes espécies vegetais, segundo modelo de LogRank (G.L.=1 $p<0,05$)^a

	Milho	Maria-pretinha	Capim-carrapicho	Braquiária	Buva	Capim-arroz
Milho		$1,23 \times 10^{-10}$	0,00	0,00	0,00	0,00
Maria-pretinha	$1,23 \times 10^{-10}$		$1,88 \times 10^{-14}$	$1,56 \times 10^{-7}$	3×10^{-15}	3×10^{-15}
Capim-carrapicho	0,00	$1,88 \times 10^{-14}$		0,04	0,91	0,91
Braquiária	0,00	$1,56 \times 10^{-7}$	0,04		0,04	0,04
Buva	0,00	3×10^{-15}	0,91	0,04		1,00
Capim-arroz	0,00	3×10^{-15}	0,91	0,04	1,00	

^a Valores estatisticamente significativos em negrito

Tabela 3 – Valores de p obtidos na comparação de curvas de sobrevivência de *D. maidis* entre diferentes espécies vegetais, segundo modelo de LogRank (G.L.=1 $p<0,05$)^a

	Milho	Nabo-forrageiro	Capim-colonião	Gramma-seda	Trapoeiraba	Capim-barba-de-bode
Milho		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nabo-forrageiro	0,00		0,08	0,00	0,20	0,16
Capim-colonião	0,00	0,08		0,22	0,55	0,58
Gramma-seda	0,00	0,00	0,22		0,02	0,08
Trapoeiraba	0,00	0,20	0,55	0,02		0,87
Capim-barba-de-bode	0,00	0,16	0,58	0,08	0,87	

^a Valores estatisticamente significativos em negrito

Tabela 4 – Valores de p obtidos na comparação de curvas de sobrevivência de *D. maidis* em três espécies vegetais, em função de sexo e infectividade com o fitoplasma do milho, segundo modelo de LogRank (G.L.=1 $p<0,01$)^a

Espécies vegetais	Machos (Não infectivos x Infectivos)	Fêmeas (Não infectivos x Infectivos)	Casais (Não infectivos x Infectivos)	Não infectivos (Machos x Fêmeas)	Infectivos (Machos x Fêmeas)	
Milho	$2,13 \times 10^{-8}$	$3,86 \times 10^{-6}$	$1,81 \times 10^{-12}$	0,908	0,441	
Maria-pretinha	$6,33 \times 10^{-6}$	0,246	0,00585	0,656	0,00418	
Braquiária	0,732	0,0001	0,00102	0,385	0,00213	
	Machos Não infectivos	Machos Infectivos	Fêmeas Não infectivas	Fêmeas Infectivas	Casais Não infectivos	Casais Infectivos
Milho x Maria-pretinha	$4,55 \times 10^{-12}$	0	$1,55 \times 10^{-11}$	$2,06 \times 10^{-9}$	0	0
Milho x Braquiária	0	0	0	$5,14 \times 10^{-14}$	0	0
Maria-pretinha x Braquiária	$4,08 \times 10^{-9}$	0,0173	$3,16 \times 10^{-7}$	0,143	$3,51 \times 10^{-3}$	0,0177

^a Valores estatisticamente significativos em negrito

4.3 Transmissão de MBSP por espécies de cigarrinhas presentes na vegetação espontânea

Das três espécies testadas, incluindo duas de ocorrência muito frequente em vegetação espontânea (*A. albidula* e *P. flavicosta*), apenas o vetor já conhecido, *D. maidis*, transmitiu o fitoplasma do milho no experimento (Tabela 5). A transmissão por *D. maidis* iniciou-se entre o décimo terceiro e décimo oitavo dia após o término do PAA de 7 dias, observando-se 40% de plantas-teste com sintomas. A eficiência de transmissão aumentou no período do décimo oitavo ao vigésimo terceiro dia (73%), estabilizando-se em 67% nos PAIs subsequentes (Figura 5). Considerando-se que para *D. maidis* foram usados 3 indivíduos por planta-teste, obtendo-se uma taxa de transmissão de aproximadamente 70% nas condições do presente experimento, pode-se estimar a probabilidade de transmissão por indivíduo em 33,1%, aplicando-se a fórmula de Swallow (1985).

Figura 5 - Eficiência de transmissão do fitoplasma do milho por *D. maidis* para plantas-teste de milho (3 indivíduos por planta) durante sucessivos períodos de acesso à inoculação (PAI) de 5 dias, após um período de acesso à aquisição (PAA) de 7 dias.

Os mollicutes do milho, MBSP e *S. kunkelii*, exploram uma gama restrita de cicadelídeos vetores, todos pertencentes à subfamília Deltocephalinae, principalmente ao gênero *Dalbulus*, mas podendo ser transmitidos por espécies de outros gêneros, tais como *Graminella nigrifrons* (Forbes), no caso de MBSP e *Exitianus exitiosus* (Uhler), *G. nigrifrons* e *Stirellus bicolor* (Van Duzee), no caso de

S. kunkelii (NAULT, 1980; MADDEN et al., 1984b; MOYA-RAYGOZA; NAULT, 1998; EBBERT; NAULT, 1994). Recentemente foi relatada a transmissão experimental de *S. kunkelii* pela espécie *Exitianus obscurinervis* (Stål) (CARLONI et al., 2011).

Apesar de certos fitoplasmas possuírem uma ampla gama de vetores naturais e experimentais (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006), os resultados obtidos para MBSP até o momento sugerem uma maior especificidade de vetores no caso do MBSP. Nault (1980) obteve insucesso na transmissão de MBSP pelos cicadelídeos *E. exitiosus* e *S. bicolor*, que pertencem à mesma subfamília de *D. maidis* (Deltocephalinae). No presente estudo, houve insucesso na tentativa de transmissão de MBSP pelos cicadelídeos *A. albidula* (subfamília Agalliinae) e *P. flavicosta* (Deltocephalinae), embora tais espécies tenham sido criadas sobre plantas de milho em laboratório, indicando que se alimentam no floema desta planta, e poderiam, teoricamente, adquirir e inocular o fitoplasma. Novos estudos de transmissão devem avaliar como vetores de MBSP outras espécies de Deltocephalinae que sejam abundantes em vegetação de cobertura e filogeneticamente mais próximas à tribo de *D. maidis* (Macrostelini).

É possível que a alta especificidade de vetores para MBSP esteja relacionada com a baixa variabilidade genética encontrada nesse fitoplasma. São escassos os estudos sobre a variabilidade genética do fitoplasma do milho. Apenas um estudo foi realizado utilizando-se a técnica de RFLP para isolados de MBSP e *S. kunkelii* coletados em três estados brasileiros. Foi encontrada pouca variabilidade genética para o espiroplasma e nenhuma diferença genética entre os isolados de MBSP (GOMES et al., 2004). A avaliação da variabilidade de um gene de MBSP que codifica uma proteína homóloga à proteína SAP11 de AYWB mostrou alta similaridade entre os isolados avaliados e nenhuma variabilidade na proteína expressa (CANALE et al., 2014, M. C. CANALE, dados não publicados).

¹ Informação fornecida por Canale em Piracicaba, em 2015.

Tabela 5 - Teste de transmissão do fitoplasma do milho por três espécies de cigarrinhas em sucessivos períodos de acesso à inoculação (PAI) (Temp.: 25 ± 5°C)

PAI (dias após aquisição)	Espécie	Proporção de plantas sintomáticas		Proporção de insetos positivos por PCR ^b	
		Inoculadas ^a	Controle Negativo	Infectivos	Controle Negativo
8-13	<i>Dalbulus maidis</i>	0/15	0/5	-	-
	<i>Planicephalus flavicosta</i>	0/15	0/5	-	-
	<i>Agallia albidula</i>	0/15	0/5	-	-
13-18	<i>D. maidis</i>	6/15	0/5	-	-
	<i>P. flavicosta</i>	0/15	0/5	-	-
	<i>A. albidula</i>	0/15	0/5	-	-
18-23	<i>D. maidis</i>	11/15	0/5	-	-
	<i>P. flavicosta</i>	0/15	0/5	-	-
	<i>A. albidula</i>	0/15	0/5	-	-
23-28	<i>D. maidis</i>	10/15	0/5	-	-
	<i>P. flavicosta</i>	0/15	0/5	-	-
	<i>A. albidula</i>	0/15	0/5	-	-
28-33	<i>D. maidis</i>	10/15	0/5	0/5	0/5
	<i>P. flavicosta</i>	0/15	0/5	0/5	0/5
	<i>A. albidula</i>	0/15	0/5	0/5	0/5

^a Avaliação de sintomas de infecção pelo fitoplasma do milho foi realizada aos 60 dias após o PAI de 5 dias, no qual foram utilizadas cinco cigarrinhas por planta-teste para as espécies *P. flavicosta* e *A. albidula*, e três cigarrinhas por planta-teste para a espécie *D. maidis*. Antes do primeiro PAI, os insetos foram submetidos a um período de acesso à aquisição de 7 dias em planta-fonte do fitoplasma

^b Para cada tratamento, amostras de dois insetos foram testadas quanto a presença do fitoplasma após o último PAI

4.4 Efeito da infecção de plantas de milho por MBSP sobre a oviposição e sobrevivência de imaturos de *D. maidis* e *A. albidula*

Observou-se que tanto *D. maidis* quanto *A. albidula* ovipositaram mais em plantas assintomáticas infectadas com o fitoplasma do milho do que em plantas não infectadas. Não houve diferença estatística entre as duas espécies quanto ao número de ovos colocados em milho (Figura 6). Quanto ao número de ninfas eclodidas, poucas foram observadas para espécie *A. albidula*, com médias de 0,8 e 0,5 ninfas por planta, sobre plantas infectadas e não infectadas, respectivamente, que não diferiram estatisticamente (Figura 7). *D. maidis* apresentou um número muito maior de ninfas eclodidas em relação à *A. albidula*, sendo a média maior em plantas infectadas (17,5) do que em plantas não infectadas (11,6) pelo fitoplasma (Figura 7). Os números médios de adultos de *A. albidula* obtidos por planta de milho infectada (1,0) e não infectada (0,7) não diferiram estatisticamente, e também foram muito mais baixos que os observados para *D. maidis* (20,0 e 12,4, respectivamente), os quais diferiram estatisticamente (Figura 8).

Figura 6 - Número médio de ovos para as espécies *A. albidula* e *D. maidis* em plantas não-infectadas e infectadas com o fitoplasma do milho. Letras representam diferença estatística significativa para o teste glm de Poisson, maiúscula entre espécies, minúscula entre plantas (G.L=19; $p < 0,01$)

Devido ao baixo número de adultos emergidos para a espécie *A. albidula*, só foi possível calcular a razão sexual ($RS = \frac{N^{\circ} \text{ de fêmeas}}{N^{\circ} \text{ de machos} + N^{\circ} \text{ de fêmeas}}$) para a espécie *D. maidis*, cujos valores médios foram de 0,46 em plantas infectadas e 0,5 em plantas não infectadas pelo fitoplasma, não havendo diferença estatística significativa (Figura 9).

Figura 7 - Número médio de ninfas para as espécies *A. albidula* e *D. maidis* em plantas não-infectadas e infectadas com o fitoplasma do milho. Letras representam diferença estatística significativa para o teste glm de Poisson, maiúscula entre espécies, minúscula entre plantas (G.L=19; $p < 0,01$)

Figura 8 - Número médio de adultos para as espécies *A. albidulla* e *D. maidis* em plantas não-infectadas e infectadas com o fitoplasma do milho. Letras representam diferença estatística significativa para o teste glm de Poisson, maiúscula entre espécies, minúscula entre plantas (G.L=19; $p<0,01$).

Patógenos que dependem de vários hospedeiros e vetores para completar seu ciclo podem alterar o comportamento e o desenvolvimento de seus hospedeiros e vetores, pois seu desempenho está ligado ao desempenho dos mesmos (SUGIO et al 2011a). Entre fitoplasmas, mudanças no desenvolvimento em suas plantas hospedeiras podem interferir no processo de seleção hospedeira e na biologia do vetor, de forma a aumentar a atratividade e o desempenho do vetor (SUGIO et al., 2011a; SUGIO et al., 2011b; MACLEAN et al, 2014).

Fitoplasmas secretam proteínas que interagem com fatores de transcrição da planta hospedeira, alterando processos fisiológicos (BAI, et al., 2009; SUGIO et al., 2011b; MACLEAN et al., 2014). A atuação destas proteínas foi mais estudada para 'Aster Yellows phytoplasma'; o genoma deste fitoplasma foi sequenciado e 56 proteínas efetoras foram identificadas, sendo que duas delas (SAP11 e SAP54) foram estudadas quanto à função em plantas (BAI, et al., 2009; SUGIO et al., 2011b; MACLEAN et al., 2014). A proteína SAP54 está relacionada com alteração no desenvolvimento floral e a conversão de flores em tecidos vegetativos; esta proteína interfere no processo de seleção hospedeira do vetor (MACLEAN et al., 2014). Por

outro lado, a SAP11 se liga a fatores de transcrição da planta, os quais promovem a expressão de genes de lipooxigenases que estão envolvidos na síntese do ácido jasmônico, que é um hormônio vegetal relacionado às respostas de defesa da planta contra a herbivoria (SUGIO et al., 2011b). Plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* com o gene que codifica SAP11 e plantas com infecção pelo ‘Aster Yellows phytoplasma’ produzem menos ácido jasmônico quando feridas. Esta redução na produção do ácido jasmônico beneficia o vetor, pois reduz as respostas de defesa da planta (SUGIO et al., 2011b).

Figura 9 - Razão sexual para a espécie *D. maidis* em plantas Infectadas e não-infectadas com o fitoplasma do milho. Letras representam diferença estatística significativa para o teste glm Binomial (G.L=9; $p<0,01$)

O fitoplasma do milho (MBSP), que pertence ao mesmo grupo do ‘Aster Yellows phytoplasma’ (grupo 16Srl), não possui seu genoma totalmente sequenciado. Porém, sabe-se que possui uma proteína homóloga a SAP11, denominada SMP11, que hipoteticamente interage com fatores de transcrição do milho relacionados ao perfilhamento (CANALE et al., 2014, M. C. CANALE, dados não publicados¹). Como um maior número de ovos, tanto de *D. maidis* como de *A. albidula*, foi encontrado em plantas infectadas com MBSP (Tabela 6), é possível que a proteína SMP11 ou outras proteínas efetoras desse fitoplasma possam estar suprimindo as defesas da planta e beneficiando a oviposição de ambas as espécies de cigarrinhas.

¹Informação fornecida por Canale em Piracicaba, em 2015.

No caso de *A. albidula* foi observada uma baixa sobrevivência das ninfas (Figura 7), sugerindo que o milho não é um bom hospedeiro para esta espécie de cigarrinha e que uma possível supressão das defesas da planta pela proteína efetora do fitoplasma não seja suficiente para promover um bom desenvolvimento das ninfas, embora a oviposição tenha sido mais elevada em plantas infectadas. No caso de *D. maidis*, que é especialista e possui um longo período de co-evolução com o milho, as ninfas provavelmente já possuem uma capacidade nata para superar as defesas do milho, não sendo necessária a supressão desses mecanismos de defesa pelo fitoplasma.

5 CONCLUSÕES

- O fitoplasma do milho, 'maize bushy stunt phytoplasma' (MBSP), apresenta alta especificidade em relação a plantas hospedeiras;
- As cigarrinhas *Planicephalus flavicosta* (Stål) e *Agallia albidula* Uhler, que habitam a vegetação espontânea de culturas de milho, não transmitem MBSP entre plantas de milho, indicando que a especificidade de vetores desse fitoplasma é elevada;
- A infecção da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), por MBSP afeta negativamente a sobrevivência de adultos deste inseto vetor;
- Plantas de milho (*Zea mays* L.) infectadas por MBSP estimulam a oviposição de *D. maidis* e *A. albidula*, porém o milho não é um bom hospedeiro para desenvolvimento de ninfas de *A. albidula*

REFERÊNCIAS

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

ARISMENDI, N.L.; CARRILLO, R. Survival, fecundity, and body mass of *Amplicephalus curtulus* influenced by 'Candidatus Phytoplasma ulmi' (16SrV-A) infection. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 155, n. 3, p. 176-183, June 2015.

BAI, X.; AMMAR, E.-D.; HOGENHOUT, S.A. A secreted effector protein of AY-MB phytoplasma accumulates in nuclei and alters gene expression of host plant cells, and is detected in various tissues of the leafhopper *Macrostelus quadrilineatus*. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 217-218, Dec. 2007.

BAI, X.; CORREA, V.R.; TORUÑO, T.Y.; AMMAR, E.-D.; KAMOUN, S.; HOGENHOUT, S.A. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 1, p. 18-30, Jan. 2009.

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**, Washington, v. 188, n. 10, p. 3682-3696, May 2006.

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**, Saint Paul, v. 85, p. 475-480, 2001.

BEANLAND, L.; HOY, C.W.; MILLER, S.A.; NAULT, L.R. Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera : Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 93, n. 2, p. 271-276, Mar 2000

BOSCO, D.; MINUCCI, C.; BOCCARDO, G.; CONTI, M. Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 83, n. 2, p. 219-224, May 1997

BRESSAN, A.; GIROLAMI, V.; BOUDON-PADIEU, E. Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence doree phytoplasma. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, Dordrecht, v. 115, n. 2, p. 283-290, May 2005.

BRESSAN, A.; CLAIR, D.; SÉMÉTEY, O.; BOUDON-PADIEU, E. Effect of two strains of Flavescence doree phytoplasma on the survival and fecundity of the experimental leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kirschbaum. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 89, n. 2, p. 144-149, June 2005.

CANALE, M.C.; ORLOVSKIS, Z.; MACLEAN, A. LOPES, J.R.S.; HOGENHOUT, S. Maize bushy stunt phytoplasma effector protein interacts with plant transcription factors and induces different phenotypes in Arabidopsis In: HANCOCK, R.; HOGENHOUT, S.; FOYER, C.H. **Mechanisms of plant-insect interactions**, Manchester: Society for Experimental Biology, 2014. p. 146.

CARLONI, E.; VIRLA, E.; PARADELL, S.; CARPANE, P.; NOME, C.; LAGUNA, I.; GIMÉNEZ PECCI, M.P. *Exitianus obscurinervis* (Hemiptera: Cicadellidae), a New Experimental Vector of *Spiroplasma kunkelii* **Arthropods in relation to plant disease**, v. 104, n. 6, p. 1793-1799, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, nono levantamento. Brasília, 2015.

CONTALDO, N.; BERTACCINI, A.; PALTRINIERI, S.; WINDSOR, G.D. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 51, n. 3, p. 607-617, 2012.

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**, Lavras, v. 4, p. 39-41, 1971.

DAVIS, R.E.; WORLEY, J.F. Spiroplasma - Motile, helical microorganism associated with corn stunt disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, n. 3, p. 403-408, 1973.

DENNEHY, J.J. What ecologists can tell to virologists. **Annual Review of microbiology**, Palo Alto, v. 68, p. 117-135, 2014.

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

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.

DUARTE, A.P.; SILVA, A.C.; DEUBER, R. Plantas infestantes em lavouras de milho safrinha, sob diferentes manejos, no médio Paranapanema. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 2, p. 285-291, 2003.

EBBERT, M.A.; JEFFERS, D.P.; HARRISON, N.A.; NAULT, L.R. Lack of specificity in the interaction between two maize stunting pathogens and field collected *Dalbulus* leafhoppers. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, Dordrecht, v. 101, n. 1, p. 49-57, Oct 2001

EBBERT, M.A.; NAULT, L.R. Improved overwintering ability in *Dalbulus maidis* (Homoptera, Cicadellidae) vectors infected with *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales, Spiroplasmataceae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 23, n. 3, p. 634-644, June 1994

FERERES, A.; MORENO A. Behavioral aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. **Virus Research**, Amsterdam, v.141, p. 158–168, 2009.

FILGUEIRAS, T.S. 2016. Tripsacum in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**.

Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20514>>

FIRRAO, G.; ANDERSEN, M.; BERTACCINI, A.; BOUDON, E.; BOVÉ, J.M.; DAIRE, X.; DAVIS, R.E.; FLETCHER, J.; GARNIER, M.; GIBB, K.S.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; HARRISON, N.; HIRUKI, C.; KIRPATRICK, B.C.; JONES, P.; KUSKE, C.R.; LEE, I.M.; LIEFTING, L.; MARCONE, C.; NAMBA, S.; SCHNEIDER, B.; SEARS, B. B.; SEEMÜLLER, E.; SMART, C.D.; STRETEN, C.; WANG, K. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1243-1255, July 2004.

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 agropecuaria brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 61-65, jan. 2004.

GRAY, S.M.; BANERJEE, N. Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 63, n. 1, p. 128-148, 1999.

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

HASS, I.C.R. **Gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho**. 2005. 38 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

HRUSKA, A.J.; GLADSTONE, S.M.; OBANDO, R. Epidemic roller coaster: maize stunt disease in Nicaragua. **American Entomologist**, Lanham, v. 42, n. 4, p. 248-252, 1996.

JAKELAITIS, A.; FERREIRA, L.R.; SILVA, A.A.; AGNES, E.L.; MIRANDA, G.V.; MACHADO, A.F.L. Dinâmica populacional de plantas daninhas sob diferentes sistemas de manejo nas culturas de milho e feijão. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 1, p. 71-79, 2003.

JIMENEZ-MARTINEZ, E.S.; BOSQUE-PEREZ, N.A.; BERGER, P.H.; ZEMETRA, R.; DING, H.J.; EIGENBRODE, S.D. Volatile cues influence the response of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) to barley yellow dwarf virus-infected transgenic and untransformed wheat. **Environmental Entomology**, College Park, v. 33, p. 1207–1216, 2004.

KELLOGG, E.A.; MASON-GAMER, R.J.; MATHEWS, S.Y.; MARK P. SIMMONS, M.P.; SORENG, R.J.; SPANGLER, R.E. Phylogeny and subfamilial classification of

the grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 88, p. 373-457, 2001

KINGDOM, H.N.; HOGENHOUT, S.A. Aster yellows phytoplasma witches' broom (AYMB; 'Candidatus Phytoplasma asteris') increases survival rates of *Macrosteles quadrilineatus* and *Dalbulus maidis* on various plant species. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 225-226, Dec. 2007.

KUSKE, C.R.; KIRKPATRICK, B.C. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 42, p. 226-233, 1992.

LARSEN, K.J.; NAULT, L.R.; MOYA-RAYGOZA, G. Overwintering biology of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera, Cicadellidae): adult populations and drought hardness. **Environmental Entomology**, College Park, v. 21, n. 3, p. 566-577, June 1992

LASTRA, R.; TRUJILLO, G.E. Enfermedades del maíz en Venezuela causadas por virus y micoplasmas. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 26, p. 441-455, 1976.

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

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

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

MADDEN, L.V.; NAULT, L.R. Differential pathogenicity of corn stunting mollicutes to leafhopper vectors in *Dalbulus* and *Baldulus* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 12, p. 1608-1614, 1983.

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**, Warwick, v. 105, n. 3, p. 431-441, 1984.

MAIXNER, M.; REINERT, W.; DARIMONT, H. Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha : Macropsinae). **Vitis**, Siebeldingen, v. 39, n. 2, p. 83-84, June 2000

MACLEAN, A.M.; ORLOVSKIS, Z.; SUGIO, A.; GIBBARD, H.K.; HOGENHOUT, S.A. A tale of how phytoplasma effectors alter plant-pathogen-insect interactions: it's a mad MADS world. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, n. 11, p. 150-150, Nov. 2014.

MALAGNINI, V.; PEDRAZZOLI, F.; GUALANDRI, V.; FORNO, F.; ZASSO, R.; POZZEBON, A.; IORIATTI, C. A study of the effects of 'Candidatus Phytoplasma mali' on the psyllid *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 103, p. 65–67, 2010.

MARAMOROSCH, K. Beneficial effect of virus-diseased plants on non-vector insects. **Tijdschrift Over Plantenziekten**, Amsterdam, v. 64, n. 5-6, p. 383-391, 1958.

MARCONI, C. Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 165, n. 2, p. 199-221, Sept. 2014.

MCELHANY, J.P.; REAL, L.A.; POWER, A.G. Disease spread, spatial dynamics, and vector preference for diseased hosts: a study of barley yellow dwarf virus. **Ecology**, Oxford, v. 76, p. 444–457, 1995.

MILLER, S.A.; ZHANG, J.; HOY, C.W.; NAULT, L.R. Monitoring aster yellows infectivity in leafhoppers during the vegetable growing season by polymerase chain reaction. In: **APS meeting poster**, Rochester: Phytopathology, 1997, v. 87, p. S66.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL, J.P. List of phytoplasma hosts in Brazil. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 129-130, Dec. 2007.

MONTANO, H.G.; CUNHA JUNIOR, J.O.; PIMENTEL, J.P. Phytoplasmas in Brazil: an update. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 64, p. S251-S252, 2011.

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**, College Park, v. 91, n. 5, p. 668-676, Sept. 1998

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

_____. Origins of leafhopper vectors of maize pathogens in Mesoamerica. In: INTERNATIONAL MAIZE VIRUS DISEASE COLLOQUIUM AND WORKSHOP, 1., 1983, Wooster. **Proceedings...** Wooster: The Ohio State University, Ohio Agricultural Research and Development Center, 1983. p. 75-82.

NAULT, L.R.; GORDON, D.T.; LOAYZA, J.C. Maize virus and mycoplasmas diseases in Peru. **Tropical Pest Management**, Basingstoke, v. 27, n. 3, p. 363-369, 1981.

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 2 new species of leafhoppers. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 76, n. 2, p. 305-309, 1983.

OLIVEIRA, C.M. **Variação morfológica entre populações de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera:Cicadellidae) de algumas localidades do Brasil**. 1996. 69 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996

_____. **Variação genética entre populações de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera, Cicadellidae) e mecanismos de sobrevivência na entressafra do milho**. 2000. 167 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

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, 2004a. p. 61-88.

_____. Técnicas para criação da cigarrinha do milho e inoculação de molicutes e vírus em plantas. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. (Ed.) **Doença em milho: molicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004b. p. 89-116.

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

OLIVEIRA, E.; PAIVA, F.A. Diagnose e manejo dos enfezamentos causados por molicutes. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. (Ed.). **Doença em milho: molicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 133-146.

OLIVEIRA, E.; DUARTE, A.P.; CARVALHO, R.V.; OLIVEIRA, A.C. Molicutes e vírus na cultura do milho no Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. (Ed.). **Doença em milho: molicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 17-34.

OLIVEIRA, E.; 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 molicutes em milho no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 19-25, 2003.

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

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 safa de verão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 2, p. 38-46, 2002b.

OSHIMA, K.; MAEJIMA, K.; NAMBA, S. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 1-8 Aug. 2013.

OSHIMA, K.; ISHII, Y.; KAKIZAWA, S.; SUGAWARA, K.; NERIYA, Y.; HIMENO, M.; MINATO, N.; MIURA, C.; SHIRAISHI, T.; YAMAJI, Y.; NAMBA, S. Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. 1-9, Aug. 2011.

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

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

PURCELL, A.H. Increased survival of *Dalbulus maidis*, a specialist on maize, on non-host plants infected with mollicute plant-pathogens. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 46, n. 2, p. 187-196, Feb. 1988.

RASHIDI, M.; GALETTO, L.; BOSCO, D.; BULGARELLI, A.; VALLINO, M.; VERATTI, F.; MARZACHÌ, C. Role of the major antigenic membrane protein in phytoplasma transmission by two insect vector species. **BMC Microbiology**, London, v. 15, n. 15, p. 2-12, 2015.

SÁNCHEZ-KEN, J.G.; CLARK, L.G. Phylogeny and a new tribal classification of the Panicoideae S.L. (Poaceae) based on plastid and nuclear sequence data and structural data. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 97, n. 10, p. 1732–1748, 2010.

SCOTT, G.E.; ROSENKRANZ, E.E.; NELSON, L.R. Yield loss of corn due to corn stunt disease complex. **Agronomy Journal**, Madison, v. 69, n. 1, p. 92-94, 1977.

SEARS, B.B.; KIRKPATRICK, B.C. Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma like organisms. **American Society for Microbiology News**, Washington, v. 60, n. 6, p. 307-312, 1994.

SINCLAIR, W.A.; GRIFFITHS, H.M. Variation in aggressiveness of ash yellows phytoplasmas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 3, p. 282-288, 2000.

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

SUGIO, A.; MACLEAN, A.M.; HOGENHOUT, S.A. The small phytoplasma virulence effector SAP11 contains distinct domains required for nuclear targeting and CIN-TCP binding and destabilization. **New Phytologist**, Cambridge, v. 202, n. 3, p. 838-848, May 2014.

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**, Washington, v. 108, n. 48, p. E1254-E1263, Nov. 2011.

SUGIO, A.; MACLEAN, A.M.; KINGDOM, H.N.; GRIEVE, V.M.; MANIMEKALAI, R.; HOGENHOUT, S.A. Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 175-195, 2011.

SUZUKI, S.; OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; ARASHIDA, R.; HEE-YOUNG JUNG, H.; 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**, Washington, v. 103, n. 11, p. 4252-4257, 2006.

SWALLOW, W. H. Group testing for estimating infection rates and probabilities of disease transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 882-889, 1985.

TORUNO, T.Y.; MUSIC, M.S.; 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**, Salem, v. 77, n. 6, p. 1406-1415, Sept. 2010.

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**, College Park, v. 78, n. 3, p. 291-315, 1985

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World Agricultural Production**. Circular Series WAP 1-16 Washington, 2015.

VAZ DE MELO, A.; GALVÃO, J.C.C.; FERREIRA, L.R.; MIRANDA, G.V.; TUFFI SANTOS, L.D.; SANTOS, I.C.; SOUZA, L.V. Dinâmica populacional de plantas daninhas em cultivo de milho-verde nos sistemas orgânico e tradicional. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 521-527, 2007.

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**, Londrina, v. 28, p. 413-420, 1999.

WEINTRAUB, P.G.; BEANLAND, L. Insect vectors of phytoplasmas. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, p. 91-111, 2006.

WILSON, M.R.; WEINTRAUB, P.G. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 177-178, Dec. 2007.

YU, H.; LIU, S.; RUAN, K.; CHEN, Y.; WANG, Z. Advances in classification and biodiversity of spiroplasmas: a review. **Weishengwu Xuebao**, Beijing, v. 49, n. 5, p. 567-572, May 2009.

ZURITA, V.; 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**, Londrina, v. 29, p. 347-352, 2000.