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

Efeito do estágio de desenvolvimento da planta e densidade populacional do vetor, *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), sobre a transmissão e danos do fitoplasma do milho

Euclides de Sousa Vilanova

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

Piracicaba
2021

Euclides de Sousa Vilanova
Engenheiro Agrônomo

Efeito do estágio de desenvolvimento da planta e densidade populacional do inseto
vetor, *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), sobre a
transmissão e danos do fitoplasma do milho
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
2021

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

Vilanova, Euclides de Sousa

Efeito do estágio de desenvolvimento da planta e densidade populacional do inseto vetor, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), sobre a transmissão e danos do fitoplasma do milho / Euclides de Sousa Vilanova. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

84 p.

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

1. Enfezamento do milho 2. Maize bushy stunt phytoplasma 3. Cigarrinha-do-milho 4. Danos 5. Manejo I. Título

A minha família.

Meu pai, Espedito Vilanova, e meu irmão, Lourenço Vilanova, *in memória*.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por abençoá-la.

Ao CNPq e à Esalq/USP pelo incentivo.

À empresa Bayer pelo apoio.

Ao meu orientador, Prof. João Lopes, pelos ensinamentos acadêmico-profissional e, efetivamente, por me orientar e por ter dado o suporte necessário para a realização do estudo.

À minha família pelo incentivo e suporte de sempre.

À minha noiva, Chesliane Freitas, pelo amor e apoio em todas minhas decisões, e também por ajudar em atividades do estudo.

Aos membros do Laboratório de Insetos Vetores pelo auxílio em algumas atividades do estudo.

Aos funcionários, Francisco e Carlinhos, Dep. Entomologia e Acarologia, pelo auxílio.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE APÊNDICES	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Cultura do milho	19
2.2. Molicutes fitopatogênicos	20
2.3. Mecanismos de patogenicidade dos molicutes e alterações de plantas infectadas....	22
2.4. Transmissão de molicutes fitopatogênicos	24
2.5. Cigarrinha-do-milho.....	25
2.6. Incidência e danos causados por enfezamentos	26
2.7. Estratégias de manejo dos enfezamentos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Criação da cigarrinha-do-milho	30
3.2. Obtenção de plantas-fonte do fitoplasma e cigarrinhas infectivas.....	30
3.3. Efeito da inoculação do fitoplasma do milho variando-se a população do vetor, estádio de desenvolvimento e nível de resistência do milho	31
3.4. Eficiência de transmissão do fitoplasma do milho a partir de plantas-fonte inoculadas em estádios diferentes, com números variáveis de cigarrinhas	33
3.5. Detecção molecular do fitoplasma do milho em amostras de plantas e insetos.....	35
3.6. Análise estatística	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1. O estágio vegetativo da planta e o híbrido afetam a dinâmica de infecção do fitoplasma do milho	39
4.2. Resposta da planta à infecção pelo fitoplasma do milho.....	44
4.3. Danos à produção	49
4.4. Relação entre incidência da doença e danos à produção	54

4.5. A eficiência de transmissão do fitoplasma do milho não depende do estágio vegetativo que a planta-fonte foi inoculada	56
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICES	82

RESUMO

Efeito do estágio de desenvolvimento da planta e densidade populacional do inseto vetor, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), sobre a transmissão e danos do fitoplasma do milho

Patossistemas com alta especificidade patógeno-vetor-planta são invariavelmente favorecidos pela produção intensiva da cultura. Tal situação é bem exemplificada pela cultura do milho no Brasil, na qual os mollicutes maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) e *Spiroplasma kunkelii*, associados aos enfezamentos vermelho e pálido, respectivamente, tornaram-se patógenos de importância primária. Nesse contexto, é fundamental compreender a dinâmica de ocorrência da doença e sua relação com os danos, de modo a nortear o manejo. Esta pesquisa teve como objetivo investigar o impacto do MBSP em função de fatores como o estágio da planta em que ocorre a inoculação, densidade populacional do inseto vetor, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), e híbridos de milho. Para isso, conduziu-se um experimento de inoculação de MBSP tendo como fatores e níveis (tratamentos): estágio fenológico (V2, V5 e V9), híbrido (suscetível e tolerante a enfezamentos); densidade populacional da cigarrinha *D. maidis* (0, 5 e 15 cigarrinhas adultas/planta) e sua infectividade (cigarrinhas infectivas - expostas previamente a plantas infectadas por MBSP, e cigarrinhas não infectivas). Em diferentes períodos após a inoculação, avaliou-se a incidência de infecção por MBSP (taxa de transmissão), severidade dos sintomas e parâmetros de desenvolvimento e de produção de plantas de milho. Os resultados mostraram que, quanto mais precocemente a planta de milho for exposta à inoculação por MBSP, maior a incidência e severidade de enfezamento vermelho e redução de produção, sendo que o nível de perdas depende diretamente da incidência da doença. Inoculações em V2 reduziram o período de incubação da doença, em relação aos estádios mais tardios. A incidência foi baixa quando a planta foi inoculada em V9, ocorrendo infecções latentes (plantas assintomáticas). Verificou-se maior incidência de plantas infectadas e redução na produção em plantas expostas a maiores populações de cigarrinhas infectivas (exceto no estágio V9). A incidência de infecção foi maior para o híbrido suscetível, em todos os estádios inoculados. O híbrido tolerante mostrou baixa incidência de plantas infectadas e, quando houve infecção, as perdas de produção foram menos expressivas. Em um experimento complementar, verificou-se que as eficiências de aquisição (taxa de infectividade) e de transmissão de MBSP por *D. maidis* independe do estágio vegetativo (V2, V5 ou V9) em que plantas-fonte desse patógeno foram inoculadas e da densidade populacional de insetos infectivos (5 ou 15 cigarrinhas por planta) à qual foram expostas. Em geral, os resultados indicam a importância de um manejo eficaz de *D. maidis* ao longo do desenvolvimento da cultura, pois além da forte redução na produção quando ocorre transmissão de MBSP nos estádios iniciais, a infecção em V9 ainda pode causar danos relevantes, além de aumentar o inóculo para a disseminação do patógeno a outros cultivos. A adoção de híbridos tolerantes ao MBSP também contribui para o manejo da doença, reduzindo a incidência de infecção e perdas de produção.

Palavras-chave: Enfezamento do milho, Maize bushy stunt phytoplasma, Cigarrinha-do-milho, Danos, Manejo

ABSTRACT

Effect of plant development stadium and population density of the insect vector, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), on transmission and damage of maize bushy stunt phytoplasma

Pathosystems with high pathogen-vector-plant specificity are invariably favored by intensive crop production. This is well exemplified by corn crops in Brazil, in which the corn-stunting mollicutes maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) and *Spiroplasma kunkelii* have become pathogens of primary importance. In this context, it is essential to understand corn stunt disease dynamics and its relationship to damage, in order to guide the management. The goal of this research was to investigate the impact of MBSP depending on the plant stadium in which inoculation occurs, population density of the insect vector, the leafhopper *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) and maize hybrids. An experiment of MBSP inoculation was conducted with the following factors and levels (treatments): maize phenological stadium (V2, V5 and V9), hybrid (susceptible and tolerant), population density of *D. maidis* (0, 5 and 15 leafhoppers/plant) and its infectivity (infective leafhoppers - previously exposed to infected plants, and non-infective leafhoppers). The incidence of infected test plants (transmission rate), symptom severity, as well as maize development and yield parameters were evaluated at successive periods after inoculation. According to the results, the earlier the maize plant is inoculated with MBSP, the greater are the incidence of infected plants, severity of corn stunt disease and resulting yield losses. Inoculations in V2 reduced the disease incubation period compared with latter development stadia. The incidence was lower when the plant was inoculated in V9, and the infections were asymptomatic. Higher incidences and impact on yield were observed when the plants were exposed to the highest vector population density (except in V9 stadium). The incidence of infection was higher for the susceptible hybrid, in all inoculated stadia. The tolerant hybrid showed lower incidence of infected plants and the yield losses were lower when infection occurred. A second experiment showed that the acquisition (measured by infectivity rate) and transmission efficiencies of MBSP by *D. maidis* are not significantly influenced by the plant vegetative stadium (V2, V5 and V9) in which the source plants of this pathogen were inoculated and by the population density of infective insects (5 or 15 leafhoppers per plant) to which they were exposed. Overall, the results indicate the importance of an effective management of *D. maidis* populations over the crop development, considering the negative impact on corn yield when plants are inoculated with MBSP at the early development stadia and that late infections (in V9) still cause relevant losses and may increase the pathogen inoculum for primary spread to subsequent corn plantings. The use of MBSP-tolerant hybrids also contributes to corn stunt disease management, by reducing the incidence of MBSP infections and yield losses.

Keywords: Corn stunt, Maize bushy stunt phytoplasma, Corn leafhopper, Damage, Management

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do experimento de avaliação da transmissão do fitoplasma do milho pela cigarrinha *Dalbulus maidis* a partir de plantas-fonte inoculadas em estádios diferentes (A), com números variáveis de cigarrinhas. Para a inoculação das plantas utilizadas como fontes (tratamentos), confinou-se as cigarrinhas em gaiolas tipo clipcage (B). Após 4 semanas, realizou-se a aquisição nas plantas-fontes confinando-se cigarrinhas em gaiolas de voile, e depois foram mantidas em plantas de milho sadias (C) para o período de latência. Em seguida, as cigarrinhas foram confinadas em plantas de milho sadias (plantas-teste) para a inoculação (D).....35

Figura 2. Incidência de enfezamento vermelho em plantas-teste (n = 10) de híbridos de milho suscetível (A e B) e tolerante (C), inoculadas com o fitoplasma do milho em diferentes estádios de desenvolvimento (V2 e V5), pela cigarrinha *Dalbulus maidis* em dois níveis populacionais (5 e 15 cigarrinhas por planta-teste), durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias. Avaliações de sintomas realizadas a cada 5 dias, iniciando aos 30 dias após o PAI.....41

Figura 3. Curva de progresso do enfezamento vermelho em plantas-teste de milho de híbrido suscetível, inoculadas com o fitoplasma do milho em estádio V2 (A e B) e V5 (C) pela cigarrinha *Dalbulus maidis* em dois níveis populacionais (5 e 15 cigarrinhas por planta-teste, B e A-C, respectivamente).....42

Figura 4. Curva de progresso do enfezamento vermelho em plantas-teste de milho de híbrido tolerante, inoculadas com o fitoplasma do milho em estádio V2 pela cigarrinha *Dalbulus maidis* em dois níveis populacionais (5 e 15 cigarrinhas por planta-teste, A e B, respectivamente).....43

Figura 5. Progresso de severidade do enfezamento vermelho em plantas de milho de híbrido suscetível (A e B) e tolerante (C), inoculadas com o fitoplasma do milho em diferentes estádios vegetativos (V2 e V5) pela cigarrinha *Dalbulus maidis* em dois níveis populacionais (5 e 15 cigarrinhas por planta-teste), durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias. A avaliação da severidade baseou-se na seguinte escala de notas: 0 – sem sintomas; 0,2 – pelo menos uma folha com sintoma; 0,4 – pelo menos 25% das folhas com sintomas; 0,6 – até 50% das folhas com sintomas; 0,8 – mais de 50% das folhas com sintomas e 1,0 – sintomas em várias folhas e crescimento severamente atrofiado (Oliveira et al. 2020). Os dados apresentados representam a média das notas.46

Figura 6. Área sob a curva de progresso dos sintomas de enfezamento vermelho calculada a partir de três avaliações (65, 80 e 95 dias após a inoculação) de plantas-teste de milho de híbrido suscetível (HS) e tolerante (HT), inoculadas pelo fitoplasma do milho em diferentes estádios vegetativos (V2 e V5) com dois níveis populacionais da cigarrinha *Dalbulus maidis* (5 e 15 cigarrinhas por planta-teste), durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias. Letras diferentes entre barras denotam diferença significativa pelo teste Tukey ($P<0,05$).....47

Figura 7. Efeito da infecção pelo fitoplasma do milho na produção de plantas do híbrido suscetível inoculadas em diferentes estádios vegetativos com 5 (A) ou 15 (B) cigarrinhas por planta. Letras iguais na coluna denotam que não houve diferença significativa entre tratamentos do mesmo estágio vegetativo (letras minúsculas), ou entre tratamentos de estádios vegetativos diferentes (letras maiúsculas) (Tukey, $P>0,05$). As barras nas colunas representam o erro padrão da média. 52

Figura 8. Efeito da infecção pelo fitoplasma do milho no peso de grãos de plantas do híbrido suscetível, inoculadas em diferentes estádios vegetativos com 5 (A) ou 15 (B) cigarrinhas por planta. Letras iguais na coluna denotam que não houve diferença significativa entre tratamentos do mesmo estágio vegetativo (letras minúsculas), ou entre tratamentos de estádios vegetativos diferentes (letras maiúsculas) (Tukey, $P>0,05$). As barras nas colunas representam o erro padrão da média. 53

Figura 9. Efeito da infecção pelo fitoplasma do milho na produção (A) e no peso de grãos (B) de plantas do híbrido tolerante inoculadas no estágio vegetativo V2, variando-se o número de cigarrinhas por planta. Letras iguais ou “ns” denotam que não houve diferença significativa entre tratamentos (Tukey, $P>0,05$). As barras nas colunas são o erro padrão da média; ns: diferença não significativa..... 53

Figura 10. Porcentagem de redução da produção (A) e do peso de grãos (B) de plantas do híbrido suscetível infectadas pelo fitoplasma do milho em relação aos respectivos controles. Não houve diferença estatística pelo teste χ^2 ($P>0,05$). 54

Figura 11. Danos à produção de plantas infectadas do híbrido suscetível em função da incidência do enfezamento vermelho em diferentes períodos: A - 55 dias; B - 60 dias; C - 65 dias; D - 70 dias e E - 80 dias. 55

Figura 12. Infectividade de *Dalbulus maidis* a partir da aquisição por ninfas em plantas-fonte inoculadas com o fitoplasma do milho em estádios distintos. Depois do período de acesso à aquisição (PAA) de 4 dias em planta-fonte, seguido do período de latência (PL) de 23 dias, foi extraído o DNA de três cigarrinhas adultas/amostra (total de cinco amostras/planta-fonte ou 15 amostras/tratamento) e testado por PCR. A taxa de infectividade das cigarrinhas que se alimentaram das plantas-fonte inoculadas por 5 ou 15 cigarrinhas infectivas é representada pela coluna de cor preta e de cor branca, respectivamente. Não houve diferença entre tratamentos (Tukey, $P>0,05$). 57

Figura 13. Eficiência de transmissão do fitoplasma do milho por *Dalbulus maidis* após aquisição em plantas-fonte inoculadas em estádios distintos. As plantas-fonte foram obtidas através da inoculação de plantas saudáveis nos estádios V2, V5 e V9 (aos 12, 21 e 40 dias após a semeadura, respectivamente). Aos 28 dias do início da inoculação, foram confinadas ≈ 150 ninfas (2ª. e 3ª. Ínstares) da colônia sadia (não infectiva) por um período de acesso à aquisição (PAA) de 4 dias, seguido do período de latência (PL) de 23 dias, que foi separado por grupo conforme os tratamentos. Para avaliar a eficiência de transmissão foram confinadas 5 cigarrinhas infectivas por plantas de milho saudáveis com 2 folhas expandidas (plantas-teste), durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias. Depois de 28 (A), 42 (B) e 52 (C) dias do início da inoculação, avaliou-se a proporção de plantas com sintomas

de avermelhamento e/ou clorose nas margens das folhas novas, em um total de 24 plantas/tratamento. A coluna de cor preta representa a eficiência de transmissão do mbsp a partir de plantas-fonte inoculadas por 5 cigarrinhas infectivas, e a de cor branca por 15 cigarrinhas infectivas. Não houve diferença entre tratamentos, (Tukey, $P>0,05$).58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Número de eventos positivos em análises de PCR para o fitoplasma do milho em amostras foliares de plantas dos diferentes tratamentos de inoculação (híbrido x número de cigarrinhas x estágio vegetativo da planta), coletadas no estágio reprodutivo R3. 44
- Tabela 2. Efeito da inoculação do fitoplasma do milho e/ou exposição à cigarrinha *Dalbulus maidis* em diferentes estádios vegetativos sobre parâmetros de desenvolvimento de híbrido de milho suscetível a enfezamentos. 48
- Tabela 3. Efeito da inoculação do fitoplasma do milho e/ou exposição à cigarrinha *Dalbulus maidis* em plantas no estágio vegetativo V2 sobre parâmetros de desenvolvimento de híbrido de milho tolerante a enfezamentos. 49
- Tabela 4. Efeito da inoculação do fitoplasma do milho e/ou exposição à cigarrinha *Dalbulus maidis* em diferentes estádios vegetativos sobre o número de espigas por planta de híbrido de milho suscetível a enfezamentos. 51
- Tabela 5. Efeito da inoculação do fitoplasma do milho e/ou exposição à cigarrinha *Dalbulus maidis* em plantas no estágio vegetativo V2 sobre o número de espigas por planta de híbrido de milho tolerante a enfezamentos. 52

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A. Efeitos da inoculação do fitoplasma do milho sobre a sintomatologia e produção de plantas de milho de dois híbridos com níveis de suscetibilidade a enfezamentos distintos, inoculadas em diferentes estádios (A). Plantas-teste do híbrido suscetível mostraram sintomas típicos, ou seja, avermelhamento generalizado de folhas evoluindo para a necrose dos bordos (B). Enquanto para plantas-teste do híbrido tolerante predominou o amarelecimento de folhas (C). O estádio vegetativo em que a planta-teste foi inoculada afetou a intensidade dos sintomas (B – plantas inoculadas no estádio V2 e D - plantas inoculadas no estádio V5, e- controle). Para os dois híbridos, houve um maior número de espigas por planta infectada (representação de plantas inoculadas no estádio V2: F - híbrido suscetível e G - híbrido tolerante, em relação ao controle – H), porém foram espigas anormais (por exemplo, I-1, J-1 e K-1). Quanto mais precocemente ocorreram as inoculações, maiores os danos no tamanho de espigas e de grãos: I-1 plantas inoculadas no estádio V2, I-2 controle; K-1 plantas inoculadas no estádio V5, K-2 controle; L-1 plantas inoculadas no estádio V9, L-2 controle; inclusive para o híbrido tolerante, J-1 plantas inoculadas, J-2 controle (estádio V2).83

Apêndice B. Resultados das análises de variâncias testando os efeitos da inoculação do fitoplasma do milho em função de fatores da planta e do vetor *Dalbulus maidis*, assim como as interações de fatores. Valores de P em negrito denotam significância a 5%.....84

1. INTRODUÇÃO

A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae), é uma das pragas mais importantes para o milho, *Zea mays* L., no Brasil e em países da América Latina (Nault 1990). A cigarrinha-do-milho é uma praga importante como vetor de vírus e bactérias, visto que apenas a atividade alimentar em plantas não ocasiona danos (Toffanelli and Bedendo 2002). Além do vírus da risca, maize rayado fino virus (MRFV, gênero *Marafivirus* e família *Tymoviridae*), a cigarrinha-do-milho também é vetor dos mollicutes (bactérias da classe *Mollicutes*) *Spiroplasma kunkelii* e maize bushy stunt phytoplasma (MBSP), que são agentes etiológicos dos enfezamentos pálido e vermelho (Nault 1980), respectivamente, responsáveis por perdas significativas (Oliveira et al. 2003). No caso do MBSP, os danos são desencadeados por fatores de virulência associados à expressão de proteínas efetoras que afetam aspectos fisiológicos da planta (Orlovskis et al. 2017; Pecher et al. 2019). Como resultado, plantas infectadas frequentemente mostram avermelhamento de folhas, proliferação de espigas, subdesenvolvimento e drástica redução do potencial produtivo (Nault 1980; Orlovskis et al. 2017).

Desde a descoberta dos agentes etiológicos já ocorreram surtos de enfezamentos do milho em vários países das américas, ocasionando prejuízos elevados (Bradfute 1981; Hruska et al. 1996; Oliveira et al. 1998). Como a cigarrinha-do-milho se apresenta como a única forma de disseminação dos mollicutes, fatores que a favorecem podem implicar em mudanças na epidemiologia da doença (Moya-Raygoza and Nault 1998; Moya-Raygoza et al. 2007). Atualmente, no Brasil, os enfezamentos são doenças emergentes com ocorrência frequente em várias regiões (Galvão et al. 2020), mas originalmente possuíam o status de doença secundária e, em surtos esporádicos, registrava-se perdas (Oliveira et al. 1998). O aumento da importância dos enfezamentos é explicado pela mudança no sistema de produção do milho (Bedendo and Lopes 2019).

A inclusão da segunda safra de milho, originalmente chamada de “safrinha”, representou uma das principais alterações no calendário agrícola, resultando em maiores índices de produção, de modo que atualmente corresponde a quase 3/4 da produção total. Com a terceira safra, via sistemas irrigados ou no período de chuvas de inverno, cifras superiores estão sendo alcançadas (CONAB 2020). No entanto, tal sistema constitui um fator crítico ao manejo fitossanitário da cultura, pois com a intensificação da produção mantém-se

o milho no campo quase o ano inteiro, seja durante o período da safra ou como planta voluntária (tiguera), constituindo “ponte verde” que favorece pragas e doenças. Nesse cenário, pragas não alvo da tecnologia *Bacillus thuringiensis* (Bt) têm ganhado notória relevância, destacando-se a cigarrinha-do-milho, que vem sendo registrada em populações elevadas (Oliveira et al. 2015; Meneses et al. 2016).

Além da quebra de sazonalidade da produção do milho com o plantio de duas a três safras, frequentemente o milho é semeado de maneira escalonada na mesma área ou em propriedades circunvizinhas, favorecendo a presença de plantas em diferentes estádios. Isso, associado à elevada capacidade de dispersão da cigarrinha-do-milho (Oliveira et al. 2013), predispõe a disseminação dos patógenos. Tal condição favorece, ainda, a incidência da doença tanto no início quanto em estádios mais avançados do desenvolvimento de plantas, podendo ter implicações não apenas na progressão da doença (Massola et al. 1999b), mas também nos níveis de danos (Massola et al. 1999a).

O controle químico com tratamento de sementes e ou pulverização foliar, principal estratégia usada no manejo da cigarrinha-do-milho, mostrou-se ineficaz em evitar a transmissão dos mollicutes (Oliveira et al. 2007), visto que a cigarrinha-do-milho precisa de poucas horas para inoculá-los em plantas sadias (Alvizatos and Markham 1986; Moya-Raygoza and Nault 1998). Assim, o controle químico dificilmente impede a ocorrência de infecções primárias por cigarrinhas que já chegam infectivas ao plantio de milho (Bedendo and Lopes 2019). De forma alternativa e/ou complementar, o uso de híbridos com algum grau de tolerância aos mollicutes pode se constituir em estratégia eficaz, pois tem sido demonstrado que reduz a frequência de plantas doentes e, por consequência, os danos (Oliveira et al. 2002).

Relatos da ocorrência e prejuízos decorrentes dos enfezamentos do milho têm se tornado frequentes em várias regiões tradicionalmente produtoras de milho, sendo que vários fatores podem influenciar na magnitude dos danos. Esta pesquisa teve como objetivo investigar o impacto do enfezamento vermelho em função de fatores como o estágio vegetativo da planta em que ocorre a inoculação do fitoplasma do milho (MBSP), densidade populacional do inseto vetor (*D. maidis*) e grau de suscetibilidade/tolerância do híbrido. O impacto foi avaliado com base em incidência de infecção pelo fitoplasma (taxa de transmissão), severidade dos sintomas e parâmetros de desenvolvimento e de produção de plantas de milho. Adicionalmente, testou-se a hipótese de que a eficiência de transmissão

do MBSP por *D. maidis* não é afetada pelo estágio vegetativo em que a planta-fonte do fitoplasma foi inoculada ou pela densidade populacional de cigarrinhas infectivas à qual foi exposta durante a inoculação. As implicações dos fatores testados sobre a epidemiologia do enfezamento vermelho foram discutidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura do milho

Historicamente, o milho tem apresentado expressiva importância à humanidade, sendo direta e indiretamente uma fonte de segurança alimentar, além disso, é usado como matéria prima para a indústria, com destaque para a geração de biocombustíveis (Shiferaw et al. 2011; Tanumihardjo et al. 2020). Tal importância torna o milho uma das principais commodities agrícolas, respondendo por 39% da produção de cereal mundial (FAO 2018). Nesse cenário, o Brasil ocupa uma posição de destaque tanto no ranking de produção quanto de exportação. O Brasil é o terceiro maior produtor, atrás dos Estados Unidos e China, respectivamente, sendo o segundo que mais exporta o cereal (USDA 2020). Isso se deve, entre outros fatores, ao incremento tecnológico que propiciou a modernização do sistema de produção e a expansão da cultura para áreas pouco exploradas, por exemplo, regiões do cerrado (Bahia-Filho et al. 2008).

No Brasil, a produção de milho se dá em duas ou mais safras ao ano, constituindo um sistema de produção intensivo. Tal sistema iniciou na década de 80 com a segunda safra de milho, originalmente “safrinha”, incorporada ao calendário agrícola. Até o início da década de 90, a área e produção corresponde ao plantio da “safrinha” respondia por apenas 5% do total de milho (CONAB 2020). Posteriormente, houve uma expansão da produção em segunda safra e atualmente é amplamente praticada, passando de alternativa a principal fonte de renda aos produtores. Assim, na safra 2019/2020, quase 3/4 da área (74,4%) e produção (73%) de milho foram provenientes da segunda safra (CONAB 2020).

Normalmente, a segunda safra “safrinha” sucede a cultura da soja, mas às vezes é precedida pela primeira safra do milho. Assim, geralmente seu plantio se dá entre meados ao final do verão, sendo que a colheita é feita no inverno. Em algumas regiões é feita uma safra adicional de milho, a terceira safra, através de sistemas irrigados ou sob o regime hídrico das chuvas de inverno. Essa última situação é praticada na região conhecida por “Sealba”, a qual é formada pelos Estados de Sergipe, Alagoas e nordeste da Bahia. Esse modelo de produção tem sido adotado também no Estado de Roraima (CONAB 2020).

É inegável a importância econômica do novo sistema de produção do milho, permitindo maiores índices de produção e, conseqüentemente, maximizando a receita do

produtor. Entretanto, tal sistema favorece a ocorrência de pragas e doenças, constituindo um fator crítico ao manejo eficiente desses organismos. O cultivo quase ininterrupto mantém o milho no campo constantemente, atuando como “ponte verde” para pragas e servindo como fonte de inóculo de patógenos. Assim, algumas pragas já importantes se tornaram ainda mais relevantes devido à dificuldade de manejo em área ampla. Nesse cenário, os insetos vetores têm causado grande preocupação aos produtores nas últimas safras (Bedendo and Lopes 2019), com destaque para a cigarrinha-do-milho, *D. maidis*. Como consequência, houve um aumento significativo da incidência dos fitopatógenos transmitidos pela cigarrinha-do-milho, o MRFV, causador da risca do milho, e os mollicutes MBSP e *S. kunkelii*, que causam o enfezamento vermelho e pálido do milho (Nault 1980), respectivamente.

2.2. Mollicutes fitopatogênicos

Os fitoplasmas e espiroplasmas são bactérias procarióticas gram-positivas (1–2 μ M de diâmetro), unicelulares, sem parede celular e pertencentes à classe *Mollicutes* (Gasparich 2010). Embora sejam próximas filogeneticamente, essas bactérias têm várias características que as tornam bastante distintas (Gasparich 2010). Os fitoplasmas, originalmente denominados de organismos-tipo-micoplasmas (Doi et al. 1967), são pleomórficos, não-helicoidais e não cultiváveis *in vitro*, apesar de alguns avanços alcançados na tentativa (Contaldo et al. 2012, 2016, 2019). Os espiroplasmas, terminologia usada originalmente para descrever bactéria em milho (Davis 1973) e depois elevado ao status de gênero (Saglio et al. 1973), são bactérias móveis, com formato helicoidal e cultiváveis *in vitro* (Williamson and Whitcomb 1975; Liao 1977).

Os espiroplasmas, ao contrário de fitoplasmas que são todos fitopatogênicos, possuem ampla diversidade de hospedeiros, incluindo plantas, invertebrados e vertebrados (Bové 1997; Ballinger and Perlman 2019), com os quais mantém interações patogênicas, comensais ou mutualísticas (Ammar et al. 2004; Cacciola et al. 2017). Entretanto, somente três espécies de espiroplasmas provocam doenças em plantas: *Spiroplasma citri*, *S. kunkelii* e *S. phoeniceum* (Gasparich 2010), associadas a doença em citros (Markham et al. 1974), milho (Chen and Liao 1975; Nault 1980; Whitcomb et al. 1986) e vinca (Saillard et al. 1987), respectivamente.

Membros da classe *Mollicutes* têm um genoma reduzido (530 Kb–2220 Kb) (Gasparich 2010). Para os espiroplasmas, o sequenciamento genômico foi concluído para as três espécies, *S. citri* (Carle et al. 2010; Davis et al. 2017), *S. kunkelii* (Bai and Hogenhout 2002; Zhao et al. 2003; Davis et al. 2015) e *S. phoeniceum* (Davis et al. 2019). Enquanto apenas sete *strain* de "*Candidatus* Phytoplasma" de quatro táxons (espécies) tiveram o genoma completamente sequenciado (Kube et al. 2019), incluindo o fitoplasma do milho (MBSP) (Orlovskis et al. 2017).

A análise do genoma de espiroplasmas fitopatogênicos mostrou a ausência de muitas vias biossintéticas, no entanto, podem importar açúcar via adenosina trifosfato (ATP) e também sintetizar essa molécula (Carle et al. 2010). Se comparado com outros mollicutes, os espiroplasmas possuem mais genes envolvidos na biossíntese das purinas e aminoácidos, além de genes que atuam na regulação da transcrição (Zhao et al. 2003). Os fitoplasmas, por sua vez, têm o menor genoma entre as bactérias fitopatogênicas (Oshima et al. 2004). Devido ao tamanho reduzido, perderam genes das vias da biossíntese de aminoácidos e ácidos graxos, do ciclo do ácido tricarboxílico e transporte de elétrons/fosforilação oxidativa e síntese de ATP (Oshima et al. 2004; Bai et al. 2006; Kube et al. 2012; Namba 2019); a síntese de ATP está associada às vias da glicose (Oshima et al. 2007) e malato (Saigo et al. 2014). Ainda assim, os fitoplasmas têm genes que codificam funções celulares de replicação do DNA, transcrição, tradução e translocação de proteínas (Oshima et al. 2013; Namba 2019). A falta de muitas vias metabólicas sustenta a hipótese de que os fitoplasmas sofreram evolução redutiva (Oshima et al. 2004, 2013; Huang et al. 2020).

A identificação e caracterização de fitoplasmas não se aplica pelos métodos tradicionais aplicados às bactérias cultiváveis, visto que os postulados de Koch não são completados. Com o surgimento de ferramentas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e primers desenhados com base na sequência conservada do gene ribossomal 16S RNA (rRNA), foi possível identificá-los (Lee et al. 1998, 2000; Zhao and Davis 2016; Bertaccini and Lee 2018). Assim, para descrever um novo fitoplasma é preciso ter apenas a única sequência do gene que codifica a região 16S do rRNA (>1.200 bp) e compartilhar <97,5% de similaridade com outra espécie de fitoplasma, sendo então designado o status de "*Candidatus* (*Ca.*) fitoplasma" (IRPCM 2004). No caso de espiroplasmas, originalmente a detecção exigia o cultivo e análise por microscopia ou sorológica (Fletcher et al. 2006). Porém, atualmente a detecção também é feita via PCR

utilizando-se oligonucleotídeos desenhados a partir de regiões específicas da sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína espiralina (Foissac et al. 1997; Barros et al. 2001; Gasparich 2010).

2.3. Mecanismos de patogenicidade dos mollicutes e alterações de plantas infectadas

Os mollicutes fitopatogênicos colonizam os vasos do floema de plantas hospedeiras ocasionando doenças (MacLean and Hogenhout 2012). Os fitoplasmas, ao contrário dos espiroplasmas que infectam poucos hospedeiros (Jones and Medina 2020), são responsáveis por centenas de doenças no mundo todo (Weintraub and Beanland 2006). Entre seus hospedeiros, há várias culturas de interesse agrícola (Bertaccini et al. 2014; Kumari et al. 2019; Jurga and Zwolińska 2020).

O avanço nos estudos de base molecular tem fornecido noções importantes sobre a interação patógeno-planta (Brader et al. 2017; Kube et al. 2019; Gosavi et al. 2020), permitindo entender melhor os mecanismos associados à patogenicidade (Huang et al. 2020). As bactérias têm sistemas independentes para exportar proteínas (Economou 1999), tais como toxinas, adesinas e enzimas hidrolíticas (Hogenhout et al. 2008). Essas proteínas desempenham um papel crítico na infecção e colonização do hospedeiro, que resulta na indução da doença (Hogenhout and Loria 2008; Stavrinides et al. 2008).

O genoma de fitoplasmas tem genes do sistema de secreção Sec (Kakizawa et al. 2001, 2004; Lee et al. 2006; Bai et al. 2006), típico de *Escherichia coli*. Isso sugere que o Sec é também um mecanismo presente em fitoplasmas (Hogenhout et al. 2008). Adicionalmente, foi constatado a presença de genes do sistema de secreção YidC (Oshima et al. 2004; Bai et al. 2006), que pode funcionar independentemente ao sistema Sec (Serek et al. 2004). De acordo com Oshima et al. (2013), o sistema YidC promove a integração de proteínas de membrana, já o sistema Sec é responsável pela integração e secreção de proteínas no citoplasma do hospedeiro.

Existe ampla literatura sobre os mecanismos de patogenicidade de fitoplasmas. A infecção por esses microrganismos afeta a homeostase de nutrientes (Van Bel and Musetti 2019; Raiesi and Golmohammadi 2020) e provoca mudanças bioquímicas na planta, como evidenciado para MBSP (Junqueira et al. 2004, 2011). A regulação da expressão de genes associados à síntese de fitohormônios tem sido evidenciada (Dermastia 2019). Dentre as

várias funções que os fitohormônios desempenham, atuam como componentes do sistema de defesa da planta contra insetos-praga ou microorganismos nocivos à planta (Sugio et al. 2011; Fu and Dong 2013; Yan and Xie 2015; Paolacci et al. 2017).

Para se sobressair as estratégias de defesa da planta, os fitoplasmas secretam proteínas, também chamadas de efetores (Miché et al. 2018; Toruño et al. 2016). Os efetores alteram drasticamente as vias fisiológicas da planta e induzem alterações distintas (Hogenhout et al. 2008; Sugio et al. 2011; Orlovskis et al. 2015). As proteínas SAP11 desestabilizam o fator de transcrição conhecido por “TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA, PCF1 (TCP)” e regulam uma série de processos morfológicos e moleculares da planta (Chang et al. 2018; Pecher et al. 2019). Outros efetores de fitoplasmas, SAP54 e PHYL1, provocam conversões de flores em tecidos semelhantes a folhas (filodia) (Maejima et al. 2014; Iwabuchi et al. 2019). O TENGU, por exemplo, é uma proteína efetora que induz nanismo, proliferação de brotos no caule e esterilidade, possivelmente por mecanismos que inviabilizam as vias de sinalização de auxina e ácido jasmônico (Hoshi et al. 2009; Minato et al. 2014).

Para o fitoplasma do milho (MBSP), foi evidenciado que um homólogo de SAP11 é responsável por induzir brotações axilares e evitar o desenvolvimento da inflorescência em plantas de milho (Pecher et al. 2019). Ainda em relação ao MBSP, Orlovskis et al. (2017) demonstraram que o polimorfismo de uma lipoproteína, possivelmente um efetor, e uma lipoproteína ATP-dependente da proteína de exportação ABC, são responsáveis pelos sintomas de ramificação lateral, proliferação de espiga, plantas atrofiadas, folhas deformadas e necrosadas, folhas amareladas e avermelhamento intenso.

Em geral, os sintomas decorrentes da infecção por fitoplasmas são semelhantes àqueles causados por espiroplasmas, variando desde sintomas de vassoura de bruxa, filodia, virescência (coloração verde de flores), formação atípica de raízes secundárias, avermelhamento de folhas e caules, amarelecimento generalizado, encurtamento de entrenós e necrose do floema (Hogenhout et al. 2008; Gasparich 2010). A indução de sintomas como vassoura de bruxa e virescência representa, em tese, uma “estratégia evolutiva” de fitoplasmas para manipular os insetos vetores de modo a aumentar sua disseminação entre hospedeiros (Hogenhout et al. 2008; Sugio et al. 2011; Sugio and Hogenhout 2012; Orlovskis and Hogenhout 2016; Tomkins et al. 2018).

2.4. Transmissão de mollicutes fitopatogênicos

Como os mollicutes são restritos ao floema, os insetos que se alimentam de seiva nutritiva representam sua principal forma de transmissão (Purcell 1982; Weintraub and Beanland 2006). Assim, insetos da ordem Hemiptera se destacam por apresentarem características que os tornam exímios vetores, tais como: imaturos e adultos têm hábito alimentar similares e ambos podem transmitir essas bactérias; possuem peças bucais formadas por finos estiletes que os permitem alimentar-se sem causar danos à célula hospedeira, evitando dessa forma os compostos de defesa da planta (Weintraub and Beanland 2006). Entretanto, apenas em três táxons existem vetores de mollicutes fitopatogênicos, sendo que na família Cicadellidae encontram-se a maioria das espécies. Na subfamília Deltocephalinae, encontram-se as espécies que são vetores de espiroplasmas (Fletcher et al. 2006), e cerca de 75% das espécies vetores de fitoplasmas (Weintraub and Beanland 2006).

Deltocephalinae é a maior subfamília da família Cicadellidae, com cerca de 6.683 espécies e 923 gêneros. Essa subfamília reúne cigarrinhas monófagas e polífagas, incluindo a maioria das espécies vetores de doenças de plantas economicamente importantes no mundo (Weintraub and Beanland 2006; Zahniser and Dietrich 2013). Cigarrinhas pertencentes ao gênero *Dalbulus*, além de uma espécie do gênero *Balbulus*, são vetores do MBSP e *S. kunkelii* (Madden and Nault 1983; Oliveira and Lopes 2004). Adicionalmente, foi demonstrado experimentalmente que outras cigarrinhas podem transmitir MBSP e ou *S. kunkelii*, como as espécies *Graminella nigrifrons* (Forbes), *Exitianus exitiosus* (Uhler) e *E. obscurinervis* (Stal), além de *Stirellus bicolor* (Van Duzee) (Nault 1980; Carloni et al. 2011). Das espécies do gênero *Dalbulus*, a cigarrinha-do-milho, *D. maidis*, é a mais importante sendo o único vetor conhecido do MBSP e *S. kunkelii* no Brasil e o principal em países das Américas (Nault 1980, 1990; Oliveira et al. 2013). A espécie *D. maidis*, comumente chamada de cigarrinha-do-milho, é a única do gênero que ocorre no Brasil, sendo a mais abundante entre todas as espécies que ocorrem no milho (Oliveira et al. 2013, 2017).

A transmissão de mollicutes por insetos vetores passa por três fases bem definidas: aquisição, latência e inoculação (Purcell 1982). O período para o vetor adquirir o patógeno na fonte de inóculo (neste caso, o floema), é o período de acesso à aquisição – PAA; o período decorrido entre a aquisição e a capacidade do vetor transmitir o patógeno, é o

período de latência – PL; já o período necessário para inocular o patógeno na planta sadia, é denominado período de acesso à inoculação – PAI (Purcell 1982; Weintraub and Beanland 2006). No caso do MBSP e *S. kunkelii*, *D. maidis* precisa de um PAA e PAI de 1-2 horas (Alvizatos and Markham, 1986; Moya-Raygoza and Nault, 1998), com PL de 19-24 dias (Nault, 1980), para transmiti-los.

Os mollicutes são transmitidos de maneira persistente propagativa por insetos vetores, ou seja, após a aquisição o inseto passa a transmiti-los por toda a vida (Weintraub and Beanland 2006). Assim, o inseto vetor adquire a bactéria ao se alimentar no floema de plantas infectadas, a qual invade intracelularmente o epitélio intestinal e, ao atingir a hemocele, se multiplica e circula via hemolinfa colonizando diferentes órgãos do inseto incluindo as glândulas salivares (Ammar et al. 2004; Ammar and Hogenhout 2005; Ammar et al. 2011; González et al. 2016; Koinuma et al. 2020), através da qual uma planta sadia será inoculada com a bactéria. Fatores como o estágio do vetor e a temperatura do ambiente (Murrall et al. 1996; Moya-Raygoza and Nault 1998; Sabato et al. 2020), interferem na eficiência de transmissão. Adicionalmente, como o título bacteriano na planta tende a aumentar com o tempo (Wei et al. 2004), presumivelmente também afeta a eficiência de transmissão.

2.5. Cigarrinha-do-milho

A cigarrinha-do-milho possui cerca de 3,7 a 4,3 mm de comprimento, sendo que as fêmeas são normalmente maiores. Os adultos podem ter coloração variável em função do clima, que vai do amarelo-palha mais claro ao mais escuro. Possui duas manchas negras na região da cabeça que podem auxiliar na sua identificação. Como todo cicadelídeo, a cigarrinha-do-milho tem duas fileiras de espinhos na tíbia posterior, mas a característica chave que permite identificar essa espécie é o formato do sétimo esternito abdominal da fêmea e genitália masculina (formato de C lateralmente) (Triplehorn and Nault 1985).

A cigarrinha-do-milho tem elevado potencial reprodutivo, podendo completar o ciclo biológico em cerca de 25 dias, passando por 5 instares com duração média de 3 a 4 dias por instar (25-30°C) (Waquil et al. 1999; Nieuwenhove et al. 2016). Isso significa que, em condições favoráveis, a cigarrinha-do-milho pode completar de 4-5 gerações durante uma única safra de milho. Embora sua faixa ideal seja de 25 a 30°C, a cigarrinha-do-milho pode se

desenvolver em condições entre 17,5 a 35°C (Nieuwenhove et al. 2016). A capacidade de se desenvolver em ampla faixa de temperatura explica sua distribuição geográfica. A cigarrinha-do-milho está presente desde o Sul do Estados Unidos até as regiões temperadas da Argentina (Santana et al. 2019), sendo encontrada em todas as regiões do Brasil (Oliveira et al. 2013, 2017).

D. maidis é uma praga exclusiva da cultura do milho, assim como os molicutes, MBSP e *S. kunkelii* (Nault 1980; Nault and Delong 1980). Entretanto, durante a entressafra (ausência de plantas de milho) a cigarrinha-do-milho pode sobreviver em hospedeiros alternativos, que são gramíneas da família Poaceae (Summers et al. 2004; Oliveira et al. 2020). Entretanto, a real contribuição epidemiológica desses hospedeiros, seja para a sobrevivência das cigarrinhas ou como reservatório dos molicutes, permanece desconhecida. Outra estratégia de sobrevivência é a dispersão de adultos da cigarrinha-do-milho para áreas com plantas novas (Larsen et al. 1992; Moya-Raygoza et al. 2007; Oliveira et al. 2013).

A cigarrinha-do-milho possui o hábito, seja ninfas ou adultos, de se abrigar e se alimentar de folhas novas do cartucho. Em termos de contribuição para a disseminação dos molicutes, tanto as ninfas quanto os adultos podem adquirir os patógenos de planta infectada, porém a ninfa é mais eficiente. Entretanto, devido ao longo período de latência da bactéria no vetor, é a cigarrinha já no estágio adulto que realiza a transmissão (Nault 1980; Moya-Raygoza and Nault 1998).

As características bioecológicas da cigarrinha-do-milho supracitadas influenciam diretamente a disseminação dos molicutes, seja em escala local ou regional. Esses patógenos têm aumentado em incidência e distribuição no Brasil, sendo que a distribuição está relacionada com temperatura do ambiente (Galvão et al. 2020). Em geral, são favorecidos por temperaturas elevadas, mas respondem de maneira distinta mediante variações dessa condição ambiental, com implicações na eficiência de transmissão pela cigarrinha (Moya-Raygoza and Nault 1998; Sabato et al. 2020), e na severidade da doença (Sabato et al. 2020).

2.6. Incidência e danos causados por enfezamentos

A incidência dos enfezamentos do milho, no Brasil, se dava originalmente de forma esporádica e, atualmente, tornou-se recorrente. A oferta contínua de alimento, pelas razões descritas anteriormente (item 2.1), favorece e mantém a população da cigarrinha-do-milho e

inóculo dos molicutes bastante elevadas, propiciando maiores taxas de infectividade e níveis de incidência da doença. Massola et al. (1999b) constataram que para cada 1% de aumento na incidência dos enfezamentos há uma redução de 0,8% na produção do milho. Assim, em áreas onde a semeadura é realizada mais tardiamente (dezembro-abril), típico de segunda safra “safrinha”, pode ocorrer maior incidência dos enfezamentos e, consequentemente, maiores perdas (Oliveira et al. 2002, 2003).

Frequentemente o milho é semeado de maneira escalonada na mesma área ou em áreas circunvizinhas, favorecendo a presença de plantas em diferentes estádios vegetativos. Isso, associado à elevada capacidade de dispersão da cigarrinha-do-milho (Oliveira et al. 2013), predispõe a disseminação dos patógenos entre áreas de produção do milho. Nesse cenário, a incidência dos molicutes pode se dar no início ou em estádios mais avançados do desenvolvimento de plantas, podendo ter implicações na progressão e severidade dos enfezamentos (Massola et al. 1999b) e, por consequência, nos níveis de danos (Massola et al. 1999a).

Em estudo com *S. kunkelii* registrou-se redução da produção de 64, 49, 53, 26 e 1% a partir de plantas de milho infectadas aos 10, 24, 38, 52 e 66 dias após a semeadura, respectivamente (Massola et al. 1999a). Em outro estudo, registrou-se reduções de apenas 7% em plantas de milho infectadas entre 30 e 40 dias após a emergência (Hruska and Peralta 1997). De maneira análoga, existem evidências de que quanto mais cedo as plantas expressam os sintomas de enfezamentos maiores serão os danos (Scott et al. 1977), havendo pouco ou nenhum dano quando os sintomas aparecem após 10 semanas do plantio (Massola et al. 1999b). Adicionalmente, é oportuno destacar que o dano à produção (quantitativo e qualitativo) também pode estar associado a densidade populacional de cigarrinhas infectivas, conforme demonstrado em estudo anterior (Toffanelli and Bedendo 2002). Neste estudo, os danos registrados nos principais parâmetros de produção foram diretamente proporcionais ao número de cigarrinhas infectivas.

Em plantas infectadas por MBSP observa-se diferentes sintomas, como clorose nas folhas do cartucho, avermelhamento intenso e deformação de folhas mais velhas; além disso, é comum o surgimento de brotações laterais, encurtamento de internódios e redução do crescimento da planta (Nault 1980; Orlovskis et al. 2017). Sintomas similares são observados em plantas infectadas por *S. kunkelii*, diferindo do MBSP quanto a presença de estrias cloróticas que surgem na base da folha (Nault 1980). Plantas infectadas por esses

patógenos têm espigas pequenas, com poucos grãos e grãos menores (Sabato 2017), sendo registrado os maiores danos em híbridos suscetíveis (Toffanelli and Bedendo 2001; Oliveira et al. 2005).

2.7. Estratégias de manejo dos enfezamentos

Evitar a semeadura tardia e escalonada de milho, assim como sincronizar o plantio do milho na mesma propriedade ou em escala regional e eliminar plantas voluntárias “tigueras”, representam algumas táticas culturais que são incentivadas para prevenir ou mitigar a incidência da cigarrinha-do-milho e dos enfezamentos. No entanto, o controle químico da cigarrinha-do-milho tem sido a tática mais utilizada no Brasil. Atualmente existem cerca de 28 produtos químicos registrados para essa praga, a grande maioria sistêmico do grupo dos neonicotinóides (AGROFIT 2020). O controle químico é mais efetivamente adotado em tratamento de sementes, permitindo o controle após a emergência das plantas (Oliveira et al. 2007).

Entretanto, o período residual desses inseticidas é pequeno e variável entre os produtos comerciais. Assim, em geral, a eficácia é perdida gradativamente com o tempo, sendo que para alguns inseticidas não ultrapassa duas semanas (Silveira 2019). Embora alguns inseticidas alteram a atividade alimentar da cigarrinha-do-milho (Silveira 2019), mostram-se ineficazes quanto a evitar a transmissão dos mollicutes pela cigarrinha-do-milho (Oliveira et al. 2007; Silveira 2019).

A adoção de híbridos tolerantes, isto é, plantas que mesmo infectadas apresentarão menos danos (Agrios 2005), configura-se uma alternativa complementar ao controle químico da cigarrinha-do-milho, sendo possivelmente a estratégia mais eficaz para o manejo dos enfezamentos do milho (Wise et al. 2016). Sabe-se que em cultivares com algum grau de tolerância aos mollicutes há uma menor incidência de plantas doentes (Oliveira et al. 2002), e mesmo naquelas plantas infectadas, o dano é potencialmente menor (Oliveira et al. 2002, 2005). Nesse sentido, torna-se de fundamental importância conhecer o grau de suscetibilidade ou tolerância das cultivares de milho aos enfezamentos do milho (Cruz et al. 2014), de modo a permitir sua correta utilização como parte da estratégia de manejo desse patossistema.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP.

3.1. Criação da cigarrinha-do-milho

As cigarrinhas usadas nos experimentos de transmissão foram provenientes de uma criação mantida no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos. A criação foi originalmente estabelecida por meio da coleta de indivíduos adultos em campo de milho em Jardinópolis (20°91'S; 47°89'W), Estado de São Paulo (SP), Brasil, seguindo protocolos de limpeza e multiplicação da colônia descritos por Oliveira et al. (2017).

Para oviposição e alimentação dos insetos, utilizaram-se plantas de milho sadias do híbrido LP2019 (LongPing High-Tech Seeds and Biotechnology) no estágio de 4 a 5 folhas desenvolvidas, as quais foram produzidas em vasos de 200 mL (diâmetro de 10 cm e altura de 8 cm) com substrato comercial (Tropstrato HT, Vida Verde Ltda, Mogi-Mirim, SP), em um telado livre de insetos vetores. As plantas foram oferecidas aos insetos em gaiolas de criação com dimensões de 50 x 30 x 30 cm (Oliveira et al. 2017). A criação foi mantida em casa de vegetação equipada com sistema tipo *pad-fan* e aquecedor para controle de temperatura ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$). Semanalmente realizavam-se períodos de oviposição de 4 dias sobre novas plantas de milho, utilizando-se adultos com cerca de 7 dias após a emergência. A cada 4-7 dias após a eclosão das ninfas, adicionavam-se novas plantas de milho nas gaiolas para alimentação dos insetos em desenvolvimento. Parte das ninfas obtidas destinava-se à manutenção da criação (insetos não infectivos), e a outra para obtenção de cigarrinhas infectivas (mediante exposição a plantas infectadas com o fitoplasma do milho, MBSP), conforme descrito por Oliveira et al. (2017).

3.2. Obtenção de plantas-fonte do fitoplasma e cigarrinhas infectivas

O isolado R4 de MBSP, obtido de plantas de milho com enfezamento vermelho na Esalq/USP, Piracicaba (SP), em 2012 (Orlovskis et al. 2017), foi perpetuado em laboratório

conforme protocolos descritos por Oliveira et al. (2017). Para obtenção de plantas infectadas a serem usadas como fontes de inóculo (plantas-fonte) para os experimentos, cerca de 12 plantas sadias do híbrido de milho (LP 2019) no estágio 2-3 folhas expandidas, produzidas conforme descrito em 3.1, foram inoculadas com MBSP a cada 30 dias, utilizando-se grupos de 10 cigarrinhas infectivas por planta, durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias. Em seguida as plantas foram pulverizadas com um inseticida de contato, para eliminar ovos e eventuais cigarrinhas remanescentes, e mantidas em estufa protegida com telado anti-afídeo, repetindo a pulverização após 5 dias.

Visando produzir cigarrinhas infectivas, plantas mostrando sintomas de enfezamento vermelho, com aproximadamente 45-60 dias após a inoculação, foram usadas como fontes de inóculo. Cerca de 800-1000 ninfas de 3º. e 4º. ínstaes da criação de cigarrinhas sadias foram confinadas no interior de uma gaiola de criação (altura de 1 m e base e largura de 33 cm) contendo planta-fonte para um período de acesso à aquisição (PAA) de 4 dias em sala climatizada ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$; fotofase de 14 horas). Em seguida, as ninfas foram transferidas para gaiolas de criação contendo plantas de milho sadias no estágio de 4-5 folhas expandidas, para um período de latência (PL) de 4 semanas em sala climatizada ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$; fotofase de 14 horas). Durante o PL, substituíram-se as plantas semanalmente para evitar a eclosão de ninfas. Após o PL, as cigarrinhas já na fase adulta foram usadas nos experimentos.

3.3. Efeito da inoculação do fitoplasma do milho variando-se a população do vetor, estágio de desenvolvimento e nível de resistência do milho

Neste experimento, a incidência, severidade e impacto do MBSP em parâmetros de desenvolvimento e produção do milho foram avaliados em função da densidade populacional e infectividade do inseto vetor, *D. maidis*, e da fenologia e nível de resistência do milho. O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial ($2 \times 2 \times 2 \times 3$), com os seguintes fatores (e níveis): **híbrido** (suscetível e tolerante a enfezamentos); **infectividade do inseto** (cigarrinhas infectivas, previamente expostas a plantas-fonte de MBSP e cigarrinhas não infectivas, expostas apenas a plantas de milho sadias); **densidade populacional do vetor** (5 e 15 cigarrinhas adultas); e **estádios vegetativos** [V2, V5 e V9 (Hanway 1966), obtidos aos 13, 23 e 37 dias após a semeadura – DAS, respectivamente]. Utilizaram-se os híbridos AG9025PRO3 e AG7098PRO2 (gentilmente

fornecidos pela Bayer, Brasil) como suscetível e tolerante, respectivamente. Os controles foram representados por plantas-teste sadias (plantas de milho do mesmo híbrido e estágio fenológico) expostas a cigarrinhas não infectivas. No caso do estágio V2, utilizou-se um controle adicional sendo representado por plantas-teste sadias não expostas a cigarrinhas (ou seja, sem inoculação). No total, o experimento contou com 26 tratamentos, com 10 repetições cada (1 planta = 1 repetição).

As inoculações foram realizadas confinando-se cigarrinhas, conforme o tratamento, nas plantas-teste de milho sadias durante um PAI de 4 dias, em gaiolas de tecido voile para permitir a ventilação mantidas em estufa sem controle de temperatura e umidade. Após o PAI, as plantas-teste foram pulverizadas com um inseticida de contato (lambda-cyhalothrin (1 mL/L) plus mineral oil (4 mL/L) para eliminar os ovos e eventuais cigarrinhas remanescentes, sendo repetido após 5 dias. Durante todo o período do experimento, as plantas-teste foram mantidas em estufa do tipo túnel, com tela antiafídeo e cobertura plástica de PVC (sem controle de temperatura e umidade). As plantas-teste foram conduzidas em vasos de 5 L (diâmetro de 23 cm e altura de 19 cm) contendo uma mistura de areia, solo e substrato comercial (proporção de 1:1:1). As plantas foram irrigadas diariamente e fertirrigadas semanalmente com macro e micronutrientes nas seguintes concentrações em suspensão aquosa: 0,08 g/L de nitrato de amônia ou 0,54 g/L de sulfato de amônia; 0,91 g/L de nitrato de cálcio; 0,33 g/L de sulfato de magnésio; 0,36 g/L de nitrato de potássio; 0,14 g/L de fosfato monoamônico; 0,09 g/L de ferro; 0,03 g/L de sulfato de cobre e 0,02 g/L de sulfato de zinco.

O desenvolvimento das plantas-teste foi avaliado registrando-se o número e comprimento de internódios após a maturidade fisiológica das plantas. A altura no estágio de pendramento (VT) foi aferida desde a base do colmo até a ponta da última folha antes do pendão, conhecida como folha bandeira. A incidência de plantas com sintomas de enfezamento foi avaliada a cada 5 dias, iniciando aos 30 dias após o final da inoculação, considerando-se como sintomáticas as plantas que apresentavam avermelhamento, amarelecimento e/ou clorose nas margens de folhas mais novas (Nault 1980). A severidade da doença, aqui representada pela progressão dos sintomas referidos, foi avaliada em três períodos: 65; 80 e 95 dias após a inoculação das plantas. Para isso, foram atribuídas notas seguindo uma escala de sintomas dos enfezamentos do milho (Sabato et al. 2020). As plantas-teste também foram submetidas ao teste de detecção molecular de MBSP por PCR,

coletando-se amostras foliares no estágio R3 (Oliveira et al. 2002), que ocorreu aos 86, 69 e 47 dias após a inoculação de plantas nos estádios V2, V5 e V9, respectivamente. As amostras foram representadas pela nervura central da parte mais basal de folhas coletadas no terço médio e superior da planta (Oliveira et al. 2002).

Após a maturidade fisiológica, registrou-se o número de espigas por planta, as quais foram colhidas e debulhadas. Os grãos foram secos ao sol e a umidade determinada (14,4%), seguindo o método de estufa ($105\pm 3^{\circ}\text{C}$) das Regras para Análise de Sementes – RAS (2009). Os grãos foram pesados e a produção por planta-teste calculada. Além disso, foi aferido o peso de 50 grãos, a partir de amostras selecionadas aleatoriamente da produção de cada planta dos respectivos tratamentos.

3.4. Eficiência de transmissão do fitoplasma do milho a partir de plantas-fonte inoculadas em estádios diferentes, com números variáveis de cigarrinhas

Neste experimento, testou-se a hipótese de que a eficiência de transmissão de MBSP por *D. maidis* a partir de uma planta de milho infectada, independe do estágio em que tal planta-fonte foi inoculada e do número de insetos infectivos usados para sua inoculação. Avaliaram-se, como tratamentos de plantas-fonte, plantas de milho sadias do híbrido AG9025PRO3 submetidas a um PAI de 4 dias por grupos de 5 ou 15 cigarrinhas infectivas nos estádios V2, V5 ou V9 (aos 12, 21 ou 40 dias após a semeadura, respectivamente) (Figura 1 A). Plantas expostas por 4 dias a cigarrinhas não infectivas da criação sadia constituíram o controle negativo, totalizando sete tratamentos. As inoculações foram feitas confinando-se as cigarrinhas em uma única folha por meio de gaiolas do tipo clipcage ($5,5 \times 4$ cm) (modelo G320, Gary Plastic Packaging Corp., New York, NY), com tela antiafídeo para permitir a ventilação (Figura 1 B). Aos 20 dias do início do PAI, coletou-se a folha exposta à inoculação para teste de PCR visando confirmar a infecção por MBSP em cada planta-fonte (item 3.5).

Para o experimento de eficiência de transmissão, três plantas infectadas de cada tratamento foram utilizadas como fonte de inóculo para aquisição de MBSP por *D. maidis*, após 4 semanas do início do PAI. Em cada planta-fonte confinaram-se em gaiolas de voile 150 ninfas de 2º. e 3º. ínstar provenientes da colônia sadia de *D. maidis*, durante um PAA de 4 dias. Após esse período, as cigarrinhas foram mantidas nas mesmas gaiolas de voile separadamente por grupo, conforme a planta-fonte na qual houve a aquisição, para a

latência em plantas saudas de milho (Figura 1 C), como descrito para a produção de cigarrinhas infectivas (item 3.2). Após 23 dias de latência, os insetos adultos foram submetidos a um PAI de 4 dias em plantas de milho saudas (plantas-teste) no estágio de 2 folhas expandidas, confinando-se cinco cigarrinhas por planta-teste em gaiolas de voile (Figura 1 D). Paralelamente, de cada planta-fonte utilizada no experimento foram amostradas cigarrinhas (n=15) para testes de PCR visando avaliar a proporção de indivíduos positivos para MBSP (taxa de infectividade), seguindo o protocolo descrito no item 3.5. As etapas de PAA, latência e PAI do experimento, incluindo a inoculação das plantas-fonte foram conduzidas em casa-de-vegetação com temperaturas diárias variando entre 23 a 35°C.

Após o PAI, tanto as plantas-fonte como as plantas-teste foram pulverizadas com inseticida de contato e transferidas para uma estufa livre de insetos vetores, onde se repetiu a pulverização após 5 dias. As plantas-fonte e plantas-teste foram conduzidas em vasos de 2,5 L (diâmetro de 15 cm e altura de 12 cm) contendo uma mistura de areia, solo e substrato comercial (proporção de 1:1:1). As irrigações e fertirrigações foram feitas conforme descrito no experimento anterior (item 3.3). A presença de sintomas de enfezamento nas plantas-teste foi avaliada após 28, 42 e 52 dias do início do período de inoculação, determinando-se a proporção de plantas-teste infectadas (taxa de transmissão) para cada tratamento.

Figura 1. Etapas do experimento de avaliação da transmissão do fitoplasma do milho pela cigarrinha *Dalbulus maidis* a partir de plantas-fonte inoculadas em estádios diferentes (A), com números variáveis de cigarrinhas. Para a inoculação das plantas utilizadas como fontes (tratamentos), confinou-se as cigarrinhas em gaiolas tipo clipcage (B). Após 4 semanas, realizou-se a aquisição nas plantas-fontes confinando-se cigarrinhas em gaiolas de voile, e depois foram mantidas em plantas de milho saudáveis (C) para o período de latência. Em seguida, as cigarrinhas foram confinadas em plantas de milho saudáveis (plantas-teste) para a inoculação (D).

3.5. Detecção molecular do fitoplasma do milho em amostras de plantas e insetos

O DNA total das amostras foliares de plantas-teste, ou de insetos, foi extraído pelo método à base de *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), conforme um protocolo adaptado de Doyle and Doyle (1987). Utilizando-se um almofariz e pistilo de porcelana, foi macerado 0,7 g de tecido vegetal de cada amostra (planta) em 800 μL de tampão (2X CTAB). Após maceração e adição de 1,6 μL de mercaptoetanol, cada amostra foi homogeneizada por inversão por 2 min e incubada à 60°C por 30 min, sendo que a cada 10 min foi novamente homogeneizada em agitador tipo vórtex. Após a incubação, adicionou-se 600 μL

de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico, 24:1) e as amostras foram homogeneizadas por inversão por 2 min e centrifugadas (12.000 rpm) por 10 min à 25°C. A seguir, pipetou-se 500 µL do sobrenadante de cada amostra para um novo microtubo e adicionou-se igual volume de isopropanol gelado (-20°C). As amostras foram homogeneizadas por inversão por 2 min e incubadas por 15 min em ultra freezer (-80°C) para precipitação dos ácidos nucleicos. Posteriormente, foram centrifugadas (12.000 rpm) por 20 min a 20°C e o sobrenadante foi descartado, sem perder o precipitado (“pellet”). O precipitado foi lavado adicionando-se 1 mL de etanol 80% e incubado por 5 min, repetindo este procedimento duas vezes. Após a lavagem, foi adicionado 500 µL de NaCl em cada amostra, seguido da homogeneização em vórtex e incubação por 30 min a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm) por 10 min a 4°C, sendo pipetado 450 µL do sobrenadante para um novo microtubo e adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado. As amostras foram novamente homogeneizadas por inversão por 2 min e na sequência incubadas por 15 min em ultra freezer (-80°C). Em seguida, foram mais uma vez centrifugadas (12.000 rpm) por 10 min a 4°C, adicionado 600 µL de etanol 80% e incubadas por 10 min. Foi descartado o etanol, sem perder o precipitado, o qual foi seco em estufa a 40°C por 20 min, seguido da diluição em 100 µL de tampão TE.

O DNA extraído foi então submetido à polymerase chain reaction (PCR) usando o Dream Taq PCR Master Mix (Thermo Scientific, São Paulo, SP). Foram utilizados os *primers* P1 (5′AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT′3) e AYint (5′TACAATTTGCAAGCAAGTTAC′3), desenhados a partir da região 16s rDNA do fitoplasma (Smart et al. 1996). As reações continham além das amostras das plantas-teste, controles positivos (obtido de PCRs prévios) e negativos (Água Milli-Q). A PCR foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, EUA) programado com um ciclo inicial de 94°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min, seguido por extensão a 72°C por 2 min e 1 ciclo a 72°C por 5 min. Em seguida, os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% suplementado com brometo etídio, usando um marcador de 1kb. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em uma imagem digital compacta Sistema, série UVDI, transiluminador Major Science.

3.6. Análise estatística

Para analisar a dinâmica temporal da doença, no primeiro experimento, utilizou-se o modelo monomolecular [$y = 1 - (1 - y_0) \cdot \exp(-r \cdot t)$], onde y é a taxa de incidência da doença, y_0 o inóculo inicial, r a taxa de progresso da doença e t o tempo (Campbell and Madden, 1990). Um teste t de Student's ($P=0,05$) foi utilizado para comparar o parâmetro r entre tratamentos. Com base nos dados de severidade dos sintomas ao longo do tempo, determinou-se a área sob a curva através de integração trapezoidal [$\text{Área} = \sum((y_i + y_{i+1})/2(t_{i+1} - t_i))$], onde y_i e y_{i+1} são valores de incidência observados em duas avaliações consecutivas, t_{i+1} e t_i (Campbell and Madden, 1990). Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância usando os Modelos Lineares Generalizados (MLG; família quasipoisson), e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P=0,05$).

Para comparar os dados de número de eventos positivos por PCR, redução da produção e peso de 50 grãos (%) entre tratamentos, utilizou-se o teste χ^2 ($P=0,05$) com a correção de Yates. Análises de variâncias (ANOVA) foram utilizadas quando as pressuposições de normalidade dos dados foram atendidas, ou seja, quando se confirmou a homocedasticidade das variâncias e a normalidade dos resíduos pelo teste de Bartlett e Shapiro-Wilk ($P=0,05$), respectivamente. Tais pressuposições foram atendidas em dados de produção e peso de 50 grãos (g), altura e comprimento de internódios (cm) (esse último para o híbrido tolerante). Para os dados do peso de 50 grãos foi necessário a transformação [$\log(y)$]. Em caso de significância dos fatores, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ($P=0,05$). Os dados do número de espigas, número e comprimento de internódios (esse último para o híbrido suscetível) não atenderam as pressuposições de normalidade, mesmo quando submetidos à transformação [$\log(y)$]. Assim, para esses dados utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e quando houve efeito significativo dos fatores, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Dunnett's ($P=0,05$).

Todas as análises foram realizadas separadamente para cada híbrido (exceto para os dados da área sob a curva de progresso da severidade dos sintomas) sendo considerado somente os dados de plantas infectadas (ou seja, plantas sintomáticas e/ou positivas por PCR) e, evidentemente, os dados de plantas dos respectivos controles. Para o híbrido tolerante, foram analisados somente os dados dos tratamentos representados pelo estágio V2, uma vez que para os demais tratamentos não houve um número suficiente de plantas

infectadas para que os dados pudessem ser analisados estatisticamente. Assim, fixou-se o estádio V2 e testou-se os efeitos apenas dos fatores infectividade da cigarrinha e densidade populacional do vetor (Apêndice B).

As funções dos danos causados a produção foram obtidas através de regressão linear ($Y=\alpha+\beta X$), sendo considerada a incidência da doença como a variável independente, expressa em porcentagem de plantas sintomáticas por tratamento em diferentes períodos pós-inoculação, e a redução na produção (%) como a variável dependente ou resposta. A porcentagem de redução foi calculada com base na produção de plantas-teste infectadas em relação aos tratamentos controle. Tal análise foi realizada apenas para o híbrido suscetível, pelas mesmas razões descritas anteriormente.

No caso do segundo experimento, os dados da taxa de infectividade das cigarrinhas e da proporção de plantas sintomáticas obtidos no experimento de eficiência de transmissão do MBSP por *D. maidis*, também foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Em caso de significância, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P=0,05$).

Todas as análises foram realizadas usando o software estatístico R [versão 3.6.2; R Core Team (2019)]. A qualidade dos ajustes dos modelos foi avaliada por meio do pacote hnp (Moral et al. 2017). O pacote agricolae foi usado para aplicar o teste de Tukey (Mendiburu 2020).

4. RESULTADOS

4.1. O estágio vegetativo da planta e o híbrido afetam a dinâmica de infecção do fitoplasma do milho

A incidência final da doença variou de 0-100% e 0-50% entre tratamentos do híbrido suscetível e tolerante, respectivamente (Figura 2). Independente do híbrido, as plantas submetidas à inoculação pelo fitoplasma do milho no estágio V9 não manifestaram quaisquer sintomas típicos do enfezamento vermelho, tal qual verificado em plantas do híbrido tolerante inoculadas no estágio V5 por 5 e 15 cigarrinhas infectivas (exceto uma planta desse último tratamento). Não houve sintomas em plantas dos controles, aqui representados por plantas-teste expostas às cigarrinhas não infectivas (controle de sanidade dos insetos criados em laboratório) ou não expostas às cigarrinhas (controle da sanidade das plantas-teste usadas no experimento).

Em relação ao tempo de início de manifestação dos sintomas, que indica o período de incubação da doença, houve drástica redução em tratamentos de plantas inoculadas no estágio V2, principalmente no tratamento de inoculação por 15 cigarrinhas (Figura 2 A). No caso de plantas inoculadas no estágio V5, ou V2 (híbrido tolerante), o período de incubação foi bem maior, independentemente do nível populacional de cigarrinhas (Figura 2 B e C, respectivamente). Para o híbrido suscetível, entre os estádios vegetativos, a incidência final da doença foi maior em tratamentos de plantas inoculadas em V2, em relação aos tratamentos de plantas inoculadas em V5 e com o mesmo nível populacional de cigarrinhas (Figura 2 A e B, respectivamente). Independente do estágio de inoculação da planta e também do híbrido, a incidência da doença foi maior em tratamentos de inoculação por 15 cigarrinhas.

O modelo monomolecular testado mostrou-se adequado para a análise temporal de incidência da doença (exceto para o tratamento de plantas do híbrido suscetível inoculadas no estágio V5; dados não apresentados), com os valores do coeficiente de determinação (R^2) entre 0,89-0,95 (Figura 3 e 4). A taxa de progresso da doença (r) foi maior no tratamento de plantas inoculadas no estágio V2 por 15 cigarrinhas, diferindo do tratamento de plantas inoculadas por 5 cigarrinhas ($t = -3,09$; $Df = 12$; $P = 0,009$), e também do tratamento de plantas inoculadas em V5 por 15 cigarrinhas ($t = 2,19$; $Df = 13$; $P = 0,04$). Para esse último

tratamento, a taxa foi significativamente maior do que o tratamento de plantas inoculadas em V2 por 5 cigarrinhas ($t = -2,37$; $Df = 15$; $P = 0,03$) (Figura 3). Para o híbrido tolerante, não houve diferença entre tratamentos de plantas inoculadas em V2 por 5 e 15 cigarrinhas ($t = 0,64$; $Df = 13$; $P = 0,5$) (Figura 4).

Embora plantas-teste submetidas à inoculação no estágio V9 não apresentaram sintomas, foi detectada a infecção pelo fitoplasma do milho por meio das análises de PCR (Tabela 1), indicando que houve infecção latente (plantas assintomáticas). Inoculação de plantas no estágio V5 do híbrido suscetível também resultaram em infecção latente, sendo mais frequente em plantas inoculadas por 5 cigarrinhas infectivas ($n=3$). Infecção latente também ocorreu em planta do híbrido tolerante inoculada no estágio V2 por 15 cigarrinhas ($n=1$). O oposto, ou seja, plantas sintomáticas testando negativo por PCR, também ocorreu, sendo constatado para plantas inoculadas no estágio V2 por 5 cigarrinhas, tanto no híbrido tolerante ($n=1$) como no híbrido suscetível ($n=2$), assim como em planta do híbrido suscetível inoculada no estágio V5 por 15 cigarrinhas ($n=1$). Estatisticamente, não houve diferença entre tratamentos do híbrido tolerante quanto ao número de plantas positivas por PCR ($P>0,05$). Entretanto, para o híbrido suscetível houve diferença significativa quanto ao número de plantas positivas entre estádios, tanto na inoculação por 5 cigarrinhas ($X^2 = 10,62$; $Df = 2$; $P = 0,004$) quanto por 15 cigarrinhas ($X^2 = 8,75$; $Df = 2$; $P = 0,01$) (Tabela 1).

Figura 2. Incidência de enfezamento vermelho em plantas-teste ($n = 10$) de híbridos de milho suscetível (A e B) e tolerante (C), inoculadas com o fitoplasma do milho em diferentes estádios de desenvolvimento (V2 e V5), pela cigarrinha *Dalbulus maidis* em dois níveis populacionais (5 e 15 cigarrinhas por planta-teste), durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias. Avaliações de sintomas realizadas a cada 5 dias, iniciando aos 30 dias após o PAI.

Figura 3. Curva de progresso do enfezamento vermelho em plantas-teste de milho de híbrido suscetível, inoculadas com o fitoplasma do milho em estágio V2 (A e B) e V5 (C) pela cigarrinha *Dalbulus maidis* em dois níveis populacionais (5 e 15 cigarrinhas por planta-teste, B e A-C, respectivamente).

Figura 4. Curva de progresso do enfezamento vermelho em plantas-teste de milho de híbrido tolerante, inoculadas com o fitoplasma do milho em estágio V2 pela cigarrinha *Dalbulus maidis* em dois níveis populacionais (5 e 15 cigarrinhas por planta-teste, A e B, respectivamente).

Tabela 1. Número de eventos positivos em análises de PCR para o fitoplasma do milho em amostras foliares de plantas dos diferentes tratamentos de inoculação (híbrido x número de cigarrinhas x estágio vegetativo da planta), coletadas no estágio reprodutivo R3.

Híbrido	Nº. cigarrinhas por planta	Estádio da planta /DAS	Proporção de amostras positivas para o fitoplasma ¹
Suscetível	5	V2/13	6/10 a AB ²
		V5/23	10/10 a A
		V9/37	3/10 a B
	15	V2/13	10/10 a A
		V5/23	9/10 a AB
		V9/37	5/10 a B
Tolerante	5	V2/13	2/10 a A
		V5/23	0/10 a A
		V9/37	0/10 a A
	15	V2/13	6/10 a A
		V5/23	1/10 a A
		V9/37	2/10 a A

¹ Cada amostra (n = 10) representou uma planta-teste, a qual foi processada individualmente para extração do DNA e analisada por PCR convencional. ² Letras iguais denotam que não há diferença entre tratamentos com 5 e 15 cigarrinhas infectivas no mesmo estágio (minúsculas) ou entre tratamentos em estádios diferentes para a mesma população de cigarrinhas (maiúsculas), pelo teste de χ^2 ($P > 0,05$). As análises foram feitas separadamente para cada híbrido. DAS: número de dias após a semeadura em que foi realizada a inoculação.

4.2. Resposta da planta à infecção pelo fitoplasma do milho

A sintomatologia variou em função do estágio vegetativo da planta submetido à inoculação e do híbrido. Plantas inoculadas no estágio V2 do híbrido suscetível se tornaram infectadas mostrando avermelhamento intenso, já no estágio V5 variou entre amarelecimento e estrias avermelhadas (menor intensidade) em folhas do terço superior. Por outro lado, em plantas do híbrido tolerante predominou o amarelecimento de folhas, evoluindo em intensidade com o tempo (Apêndice A).

A progressão dos sintomas da doença no tempo foi diferente entre tratamentos (Figura 5), afetando significativamente a área calculada sob a curva ($F = 17,00$; $Df = 5$; $P < 0,05$). Para o híbrido suscetível, não houve progressão dos sintomas nos tratamentos de plantas inoculadas em V5, obtendo-se os menores valores da área e diferindo de outros tratamentos (Figura 6). Entretanto, se comparada a área entre tratamentos de plantas

inoculadas por 5 e 15 cigarrinhas (fixando o estágio), não houve diferença. Entre tratamentos de plantas inoculadas em V2 (híbridos diferentes), só houve diferença com 15 cigarrinhas.

As análises de variâncias evidenciaram um efeito significativo da infectividade das cigarrinhas e do estágio vegetativo na altura de plantas do híbrido suscetível, assim como da infectividade das cigarrinhas em plantas do híbrido tolerante (Apêndice B). Entretanto, quando comparada a altura média de plantas do híbrido suscetível inoculadas por cigarrinhas infectivas com os respectivos controles de mesmo estágio, não houve diferença pelo teste Tukey ($P>0,05$), exceto quando as plantas foram inoculadas no estágio V2 por 15 cigarrinhas ($P<0,05$) (Tabela 2). Adicionalmente, quando comparado os tratamentos cujas plantas foram infectadas por 5 ou 15 cigarrinhas em estágios diferentes, não houve diferença para nenhum dos caracteres fenotípicos ($P>0,05$).

Para o híbrido tolerante, houve diferença na altura de plantas inoculadas por 5 cigarrinhas infectivas em relação às plantas do controle sem inoculação ($P=0,04$), não havendo diferença em relação às plantas do controle com cigarrinhas não infectivas ($P=0,08$); a altura de plantas inoculadas por 15 cigarrinhas diferiu de ambos os controles ($P<0,05$) (Tabela 3). Em relação ao número de internódios, não houve diferença entre tratamentos de nenhum dos híbridos, já o comprimento de internódios foi afetado em plantas do híbrido tolerante inoculadas por 15 cigarrinhas ($P=0,03$).

Figura 5. Progresso de severidade do enfezamento vermelho em plantas de milho de híbrido suscetível (A e B) e tolerante (C), inoculadas com o fitoplasma do milho em diferentes estádios vegetativos (V2 e V5) pela cigarrinha *Dalbulus maidis* em dois níveis populacionais (5 e 15 cigarrinhas por planta-teste), durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias. A avaliação da severidade baseou-se na seguinte escala de notas: 0 – sem sintomas; 0,2 – pelo menos uma folha com sintoma; 0,4 – pelo menos 25% das folhas com sintomas; 0,6 – até 50% das folhas com sintomas; 0,8 – mais de 50% das folhas com sintomas e 1,0 – sintomas em várias folhas e crescimento severamente atrofiado (Oliveira et al. 2020). Os dados apresentados representam a média das notas.

Figura 6. Área sob a curva de progresso dos sintomas de enfezamento vermelho calculada a partir de três avaliações (65, 80 e 95 dias após a inoculação) de plantas-teste de milho de híbrido suscetível (HS) e tolerante (HT), inoculadas pelo fitoplasma do milho em diferentes estádios vegetativos (V2 e V5) com dois níveis populacionais da cigarrinha *Dalbulus maidis* (5 e 15 cigarrinhas por planta-teste), durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias. Letras diferentes entre barras denotam diferença significativa pelo teste Tukey ($P<0,05$).

Tabela 2. Efeito da inoculação do fitoplasma do milho e/ou exposição à cigarrinha *Dalbulus maidis* em diferentes estádios vegetativos sobre parâmetros de desenvolvimento de híbrido de milho suscetível a enfezamentos.

Exposição a cigarrinhas			Parâmetros de desenvolvimento		
Infectividade pelo fitoplasma	Nº. insetos por planta	Estádios da planta/DAS	Altura (cm) ¹	Nº de internódios ²	Comp. de internódios (cm) ²
Cigarrinhas infectivas (plantas infectadas)	5	V2/13 (n=8) **	183,9 ± 4,8 a *	12 ± 0,3 a	10,4 ± 0,3 a
		V5/23 (n=10)	178,0 ± 2,3 a	13 ± 0,2 a	10,7 ± 0,2 a
		V9/37 (n=3)	173,0 ± 3,1 a	12 ± 0,0 a	10,5 ± 0,1 a
	15	V2/13 (n=10)	169,3 ± 3,3 b	12 ± 0,3 a	10,5 ± 0,3 a
		V5/23 (n=10)	175,5 ± 2,6 a	13 ± 0,1 a	10,1 ± 0,2 a
		V9/37 (n=5)	174,9 ± 2,0 a	12 ± 0,2 a	10,3 ± 0,1 a
	5	V2/13 (n=9)	197,4 ± 3,0 a	12 ± 0,2 a	11,9 ± 0,5 a
		V5/23 (n=10)	180,6 ± 2,6 a	13 ± 0,1 a	11,2 ± 0,2 a
		V9/37 (n=10)	173,2 ± 1,9 a	12 ± 0,2 a	10,2 ± 0,1 a
Cigarrinhas não infectivas (plantas não infectadas)	15	V2/13 (n=10)	196,7 ± 3,4 a	12 ± 0,3 a	11,2 ± 0,4 a
		V5/23 (n=10)	178,8 ± 2,5 a	13 ± 0,2 a	10,9 ± 0,3 a
		V9/37 (n=10)	172,2 ± 1,9 a	12 ± 0,1 a	10,2 ± 0,1 a
Sem exposição a cigarrinhas	0	V2/13 (n=9)	192,9 ± 3,0 a	12 ± 0,1 a	12,1 ± 0,2 a

*Médias (±EPM) seguidas de mesma letra na coluna não diferem por Tukey ($P>0,05$)¹ ou Dunnet's ($P>0,05$)². As comparações foram feitas entre médias de tratamentos cujas plantas foram expostas ao mesmo número de cigarrinhas infectivas, com os respectivos controles do mesmo estágio vegetativo.

** Entre parênteses está o número total de plantas cujos dados foram analisados estatisticamente.

DAS – Dias após a semeadura.

Tabela 3. Efeito da inoculação do fitoplasma do milho e/ou exposição à cigarrinha *Dalbulus maidis* em plantas no estágio vegetativo V2 sobre parâmetros de desenvolvimento de híbrido de milho tolerante a enfezamentos.

Exposição a cigarrinhas		Parâmetros de desenvolvimento		
Infectividade pelo fitoplasma	Nº. insetos por planta	Altura (cm) ¹	Nº de internódios ²	Comp. de internódios (cm) ¹
Cigarrinhas infectivas (plantas infectadas)	5 (n=3) **	148,7 ± 10,6 a *	15,6 ± 0,3 a	7,1 ± 0,4 a ¹
	15 (n=5)	156,4 ± 5,0 a	16,0 ± 0,0 a	7,5 ± 0,3 a
Cigarrinhas não infectivas (plantas não infectadas)	5 (n=9)	174,9 ± 6,2 ab	15,7 ± 0,3 a	8,4 ± 0,3 a
	15 (n=10)	181,6 ± 3,2 b	16,0 ± 0,3 a	8,8 ± 0,2 b
Sem exposição a cigarrinhas	0 (n=10)	178,1 ± 5,0 b	16,6 ± 0,2 a	8,2 ± 0,2 a

*Médias (±EPM) seguidas de mesma letra na coluna não diferem por Tukey ($P>0,05$)¹ ou Dunnet's ($P>0,05$)². As comparações foram feitas entre médias de tratamentos cujas plantas foram infectadas e não infectadas (controles).

** Entre parênteses está o número total de plantas cujos dados foram analisados estatisticamente.

4.3. Danos à produção

A infecção pelo fitoplasma do milho provocou um aumento do número de espigas por planta-teste dos dois híbridos. Entretanto, tais espigas, “extras”, frequentemente apresentavam-se sem grãos, poucos grãos ou com grãos pequenos (Apêndice A). Tanto para o híbrido suscetível ($X^2=85,77$; Df=2; $P<0,05$), como também para o tolerante ($X^2=37,00$; Df=2; $P<0,05$), a inoculação do fitoplasma afetou esse parâmetro. O número médio de espigas por planta infectada foi maior do que nos controles, diferindo pelo teste Dunnet's ($P<0,05$) (Tabela 4 e 5). A única exceção é para plantas do híbrido suscetível previamente inoculadas no estágio V9, para as quais não houve diferença em relação ao controle ($P=1,00$) (Tabela 4). Para o híbrido suscetível, o estágio da planta submetido à inoculação por MBSP também afetou o número de espigas ($X^2=13,06$; Df=2; $P=0,001$), diferentemente do fator densidade populacional de insetos ($X^2=5,44$; Df=2; $P=0,06$). Esse último também não afetou o número de espigas por planta do híbrido tolerante ($X^2=3,95$; Df=2; $P=0,13$) (Tabela 5). Entre plantas infectadas por 5 cigarrinhas em estádios diferentes, verificou-se que não houve diferença entre os estádios V2 e V5 ($P=1,00$), mas ambos diferiram do estágio V9

($P<0,05$); já entre plantas infectadas por 15 cigarrinhas não houve diferença entre os estádios V2, V5 e V9 ($P>0,05$) (Tabela 4).

Isoladamente, todos os fatores testados afetaram significativamente a produção de plantas do híbrido suscetível, tais como a infectividade das cigarrinhas [$F_{(1; 97)} = 129,45$; $P<0,05$], estágio vegetativo [$F_{(1; 97)} = 46,97$; $P<0,05$] e densidade populacional [$F_{(1; 97)} = 10,06$; $P=0,002$]. Por outro lado, nenhum afetou a produção do híbrido tolerante. Para ambos os híbridos não houve interação significativa dos fatores (Apêndice B).

Apesar do resultado obtido nas análises de variâncias, não houve diferença na produção média de plantas inoculadas por 5 ou 15 cigarrinhas infectivas (Tukey, $P>0,05$). Tanto em plantas inoculadas em estágio V2 quanto em V5, a produção média diferiu do controle ($P<0,05$) (Figura 7). Um resultado igual ocorreu em V9, exceto em plantas inoculadas por 15 cigarrinhas ($P=0,59$) (Figura 7 B). Curiosamente, a produção média de plantas previamente não infectadas no estágio V2 foi menor e diferiu dos outros controles (exposição às cigarrinhas não infectivas); porém, não diferiu da produção de plantas não expostas às cigarrinhas (controle sem inoculação) ($P>0,05$), indicando que não houve dano direto da cigarrinha.

Independentemente do número de cigarrinhas infectivas, a produção de plantas inoculadas no estágio V2 não diferiu de plantas inoculadas no estágio V5 ($P>0,05$), mas diferiu de plantas inoculadas no estágio V9 ($P<0,05$), e esses dois últimos não diferiram ($P>0,05$) (Figura 7). Entretanto, se comparada a redução da produção de plantas infectadas em estádios distintos, em função dos controles, não houve diferença estatística ($X^2=1,77$; $Df=2$; $P=0,41$) (Figura 10 A). Em geral, plantas inoculadas no estágio V2 tiveram as maiores reduções (%), seguido dos estádios V5 e V9. As porcentagens de danos variaram entre 14-37% para o híbrido suscetível.

A redução da produção de plantas infectadas (híbrido suscetível) por MBSP foi também um resultado da diminuição do tamanho dos grãos. Aqui, isso pôde ser demonstrado pelo peso médio dos grãos (g). Dos fatores testados, apenas a densidade populacional não afetou tal parâmetro (Apêndice B). Entretanto, plantas infectadas de todos os tratamentos tiveram o peso dos grãos menor do que o controle diferindo pelo teste Tukey ($P<0,05$) (Figura 8). No caso do híbrido tolerante, somente o tratamento cujas plantas foram inoculadas por 15 cigarrinhas infectivas diferiu dos controles ($P<0,05$) (Figura 9 B). Para o híbrido suscetível, o peso de grãos de plantas expostas às cigarrinhas não infectivas

no estágio V2 também diferiu dos outros controles, mas não diferiu de plantas sem inoculação (reafirmando que não houve dano direto).

O peso de grãos de plantas inoculados por 5 cigarrinhas infectivas no estágio V2 não diferiu do estágio V5 ($P=0,63$), mas diferiu do estágio V9 ($P=0,01$), e esses últimos não diferiram ($P=0,18$) (Figura 8 A). Para plantas inoculadas por 15 cigarrinhas infectivas, a diferença é que o peso de grãos de plantas inoculadas no estágio V5 diferiu do estágio V9 ($P<0,05$) (Figura 8 B). Em relação à redução do peso de grãos de plantas infectadas em estádios distintos, em função dos controles, constatou-se que não houve diferença ($X^2=1,55$; $Df=2$; $P=0,46$). As porcentagens de danos variaram entre 23-52% para o híbrido suscetível (Figura 10 B).

Tabela 4. Efeito da inoculação do fitoplasma do milho e/ou exposição à cigarrinha *Dalbulus maidis* em diferentes estádios vegetativos sobre o número de espigas por planta de híbrido de milho suscetível a enfezamentos.

Exposição a cigarrinhas		Estádios /DAS ¹	Nº de espigas ²
Infectividade pelo fitoplasma	Nº. Insetos por planta		
Cigarrinhas infectivas (plantas infectadas)	5	V2/13	2,0 ± 0,0 a A
		V5/23	2,0 ± 0,1 a A
		V9/37	1,0 ± 0,0 a B
	15	V2/13	2,0 ± 0,0 a A
		V5/23	2,2 ± 0,1 a A
		V9/37	1,4 ± 0,2 a A
Cigarrinhas não infectivas (plantas não infectadas)	5	V2/13	1,0 ± 0,0 b
		V5/23	1,0 ± 0,0 b
		V9/37	1,0 ± 0,0 a
	15	V2/13	1,0 ± 0,0 b
		V5/23	1,0 ± 0,0 b
		V9/37	1,0 ± 0,0 a
Sem exposição a cigarrinhas	0	V2/13	1,0 ± 0,0 b

¹DAS – Dias após a semeadura.

²Médias (± EPM) seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste Dunnet's ($P<0,05$) na comparação de número de espigas entre plantas infectadas e não infectadas (controles) (letras minúsculas), ou de número de espigas por planta infectada após inoculação em estádios diferentes (letras maiúsculas).

Tabela 5. Efeito da inoculação do fitoplasma do milho e/ou exposição à cigarrinha *Dalbulus maidis* em plantas no estágio vegetativo V2 sobre o número de espigas por planta de híbrido de milho tolerante a enfezamentos.

Exposição a cigarrinhas		
Infectividade pelo fitoplasma	Nº. Insetos por planta	Nº de espigas ¹
Cigarrinhas infectivas (plantas infectadas)	5	2,0 ± 0,0 a
	15	2,0 ± 0,0 a
Cigarrinhas não infectivas (plantas não infectadas)	5	1,0 ± 0,0 b
	15	1,0 ± 0,0 b
Sem exposição a cigarrinhas	0	1,0 ± 0,0 b

¹Médias (± EPM) seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste Dunnett's ($P < 0,05$) na comparação de número de espigas entre plantas infectadas e não infectadas (controles) (letras minúsculas).

Figura 7. Efeito da infecção pelo fitoplasma do milho na produção de plantas do híbrido suscetível inoculadas em diferentes estádios vegetativos com 5 (A) ou 15 (B) cigarrinhas por planta. Letras iguais na coluna denotam que não houve diferença significativa entre tratamentos do mesmo estágio vegetativo (letras minúsculas), ou entre tratamentos de estádios vegetativos diferentes (letras maiúsculas) (Tukey, $P > 0,05$). As barras nas colunas representam o erro padrão da média.

Figura 8. Efeito da infecção pelo fitoplasma do milho no peso de grãos de plantas do híbrido suscetível, inoculadas em diferentes estádios vegetativos com 5 (A) ou 15 (B) cigarrinhas por planta. Letras iguais na coluna denotam que não houve diferença significativa entre tratamentos do mesmo estágio vegetativo (letras minúsculas), ou entre tratamentos de estádios vegetativos diferentes (letras maiúsculas) (Tukey, $P>0,05$). As barras nas colunas representam o erro padrão da média.

Figura 9. Efeito da infecção pelo fitoplasma do milho na produção (A) e no peso de grãos (B) de plantas do híbrido tolerante inoculadas no estágio vegetativo V2, variando-se o número de cigarrinhas por planta. Letras iguais ou "ns" denotam que não houve diferença significativa entre tratamentos (Tukey, $P>0,05$). As barras nas colunas são o erro padrão da média; ns: diferença não significativa.

Figura 10. Redução (%) da produção (A) e do peso de grãos (B) de plantas do híbrido suscetível infectadas pelo fitoplasma do milho em relação aos respectivos controles. Não houve diferença estatística pelo teste χ^2 ($P > 0,05$).

4.4. Relação entre incidência da doença e danos à produção

A redução da produção foi relacionada com a incidência da doença em todos os períodos (Figura 11). A partir de 55 dias da inoculação, foi possível usar o modelo de regressão linear para relacionar a incidência com a redução da produção, com maior acurácia do modelo após 70 dias. As funções de danos foram significativas ($P < 0,05$), e com elevados valores de R^2 (0,61-0,91), em todos os períodos testados. As equações indicaram

que a cada 1% de aumento na incidência da doença houve um dano de 0,18-0,20% na produção.

Figura 11. Danos à produção de plantas infectadas do híbrido suscetível em função da incidência do enfezamento vermelho em diferentes períodos: A - 55 dias; B - 60 dias; C - 65 dias; D - 70 dias e E - 80 dias.

4.5. A eficiência de transmissão do fitoplasma do milho não depende do estágio vegetativo que a planta-fonte foi inoculada

A taxa de infectividade das cigarrinhas não foi afetada pelo estágio vegetativo em que as plantas-fonte foram inoculadas [$F_{(2; 12)} = 1,00$; $P=0,39$], tão pouco pelo número de cigarrinhas que foram expostas [$F_{(1; 12)} = 0,84$; $P=0,37$], e também não houve interação de fatores [$F_{(2; 12)} = 1,00$; $P=0,39$] (Figura 12). Pelo menos dois terços das plantas-fonte inoculadas por 15 cigarrinhas infectivas, exceto plantas-fonte inoculadas no estágio V2, proporcionaram taxa de infectividade de 100%. Em geral, a taxa média de infectividade das cigarrinhas foi elevada e variou de 60-93%.

A eficiência de transmissão do fitoplasma do milho não foi afetada pela população de cigarrinhas infectivas usados para inocular as plantas-fonte em nenhum dos períodos de avaliação: 28 dias [$F_{(1; 12)} = 1,02$; $P=0,33$], 42 dias [$F_{(1; 12)} = 1,28$; $P=0,27$] e 52 dias após a inoculação das plantas-testes [$F_{(1; 12)} = 0,62$; $P=0,44$] (Figura 13). Não houve efeito do estágio vegetativo em que as plantas-fonte foram inoculadas sobre a transmissão, 42 dias [$F_{(2; 12)} = 1,03$; $P=0,38$] e 52 dias [$F_{(2; 12)} = 1,00$; $P=0,39$], exceto no período de 28 dias da inoculação [$F_{(2; 12)} = 4,39$; $P=0,03$]. Nesse período de avaliação, a proporção média de plantas-teste sintomáticas provenientes da transmissão por cigarrinhas que adquiriu o fitoplasma de plantas-fonte inoculadas no estágio V2 foi de 25,0%, diferindo pelo teste Tukey de plantas-fonte inoculadas no estágio V5 [54,1% ($P=0,04$)] e V9 [56,2% ($P=0,03$)], não havendo diferença significativa entre esses dois últimos estádio ($P=0,98$). Em nenhum dos períodos houve interação dos fatores testados, 28 dias [$F_{(2; 12)} = 0,02$; $P=0,97$], 42 dias [$F_{(2; 12)} = 0,13$; $P=0,87$] e 52 dias [$F_{(2; 12)} = 0,08$; $P=0,91$] após a inoculação de plantas-teste.

Figura 12. Infectividade de *Dalbulus maidis* a partir da aquisição por ninfas em plantas-fonte inoculadas com o fitoplasma do milho em estádios distintos. Depois do período de acesso à aquisição (PAA) de 4 dias em planta-fonte, seguido do período de latência (PL) de 23 dias, foi extraído o DNA de três cigarrinhas adultas/amostra (total de cinco amostras/planta-fonte ou 15 amostras/tratamento) e testado por PCR. A taxa de infectividade das cigarrinhas que se alimentaram das plantas-fonte inoculadas por 5 ou 15 cigarrinhas infectivas é representada pela coluna de cor preta e de cor branca, respectivamente. Não houve diferença entre tratamentos (Tukey, $P>0,05$).

Figura 13. Eficiência de transmissão do fitoplasma do milho por *Dalbulus maidis* após aquisição em plantas-fonte inoculadas em estádios distintos. As plantas-fonte foram obtidas através da inoculação de plantas saudas nos estádios V2, V5 e V9 (aos 12, 21 e 40 dias após a semeadura, respectivamente). Aos 28 dias do início da inoculação, foram confinadas ≈ 150 ninfas (2 $^{\circ}$. e 3 $^{\circ}$. ínstaes) da colônia sadia (não infectiva) por um período de acesso à aquisição (PAA) de 4 dias, seguido do período de latência (PL) de 23 dias, que foi separado por grupo conforme os tratamentos. Para avaliar a eficiência de transmissão foram confinadas 5 cigarrinhas infectivas por plantas de milho saudas com 2 folhas expandidas (plantas-teste), durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias. Depois de 28 (A), 42 (B) e 52 (C) dias do início da inoculação, avaliou-se a proporção de plantas com sintomas de avermelhamento e/ou clorose nas margens das folhas novas, em um total de 24 plantas/tratamento. A coluna de cor preta representa a eficiência de transmissão do MBSP a partir de plantas-fonte inoculadas por 5 cigarrinhas infectivas, e a de cor branca por 15 cigarrinhas infectivas. Não houve diferença entre tratamentos, (Tukey, $P > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O fitoplasma do milho é uma bactéria biotrófica, que se replica intracelularmente no floema. Nesse estudo, mostramos que a incidência do enfezamento vermelho foi influenciada tanto pelo estágio de desenvolvimento em que as plantas foram inoculadas, como também pela população de cigarrinhas e nível de tolerância do híbrido. Embora a população de cigarrinhas infectivas não tenha influenciado expressivamente a proporção final de plantas doentes, houve aparente tendência de maior proporção de plantas sintomáticas, e de eventos positivos nas análises de PCR, naqueles tratamentos expostos à maior população do inseto vetor, ou seja, 15 cigarrinhas/planta. Adicionalmente, o período de incubação foi drasticamente reduzido nas plantas suscetíveis inoculadas precocemente (13 DAS) por maior população. A taxa de progresso da doença também foi maior em tratamentos de plantas inoculadas por 15 cigarrinhas (Figura 3). Entre os caracteres fenotípicos, apenas a altura de plantas inoculadas precocemente por maior população de cigarrinhas foi afetada de forma significativa.

Coletivamente, esses resultados sugerem que houve elevada atividade do fitoplasma a partir das plantas inoculadas por maior população de cigarrinhas infectivas, o que deve estar relacionado ao título do inóculo inicial. Considerando que há progressão temporal do título do fitoplasma a partir de plantas expostas à inoculação única, ou seja, com apenas uma cigarrinha (Galvão 2019), é razoável supor que quanto maior a população de cigarrinhas maior será o inóculo inicial e, conseqüentemente, mais rápida será a taxa de multiplicação do fitoplasma, o que em tese explicaria o curto período de incubação e sintomas mais severos.

Em estudo com *S. kunkelii*, Gussie et al. (1995) verificaram tendência de maior título bacteriano a partir de plantas inoculadas por maior população de cigarrinhas, nas quais houve expressão de sintomas mais severos. Esses autores também constataram que o período de incubação da doença foi reduzido de 1-2 semanas se comparada às plantas inoculadas no estágio de uma folha com plantas inoculadas no estágio de quatro folhas, indicando que o tempo para expressão da doença tem relação com a idade das plantas-teste. Em outros patossistemas, tais como "*Candidatus* (Ca) *Liberibacter solanacearum*" versus batata (Rashed et al. 2012), e *Xylella fastidiosa* versus alfalfa (Lopes et al. 2010), o

inóculo inicial também é preponderante para a taxa de eventos bem-sucedidos de inoculação.

Em geral, a porcentagem de plantas doentes variou entre 90%, 80% e 0% (híbrido suscetível), e entre 40%, 5% e 0% (híbrido tolerante), a partir de plantas inoculadas com 13, 23 e 37 DAS, respectivamente. Nessa ordem, a porcentagem de eventos positivos para o fitoplasma nas análises de PCR variou entre 80%, 95% e 40%, e entre 40%, 5% e 10%, respectivamente. Outros estudos também relataram uma menor incidência de plantas infectadas a partir de híbridos tolerantes aos mollicutes (Oliveira et al. 2002; Coelho et al. 2017). Entretanto, o mecanismo subjacente a essa evidência, ou seja, os fatores genéticos que governam a tolerância, não estão muito bem compreendidos (Silveira et al. 2008; Teixeira et al. 2013; Teixeira and Sabato 2017; Oleszczuk et al. 2020).

O fato de que plantas com sintomas do fitoplasma do milho testou negativo por PCR, bem como plantas assintomáticas testou positivo por PCR, é consistente com relatos anteriores, sendo que a primeira evidência pressupõe que o fitoplasma assume uma distribuição irregular na planta (Oliveira et al. 2002). Por outro lado, a presença de plantas assintomáticas, majoritariamente a partir de plantas inoculadas no estágio V9, indica que houve infecção latente (Hayward 1974), o que pode estar associado a uma resposta fisiológica da planta à infecção (Musetti 2009). Somado a isso, vale a pena notar que, o período de incubação e severidade da doença diferiu por ocasião da idade em que as plantas foram expostas à inoculação. Coletivamente, essas evidências sugerem que as plantas inoculadas nos estádios de desenvolvimento mais avançados conferiram algum grau de bloqueio à infecção pelo fitoplasma, como já relatado para outros patossistemas (Leisner et al. 1993; Kus et al. 2002; Whalen 2005; Hu and Yang 2019).

Embora houvesse variabilidade no quadro de severidade da doença em razão do estágio da planta exposto à inoculação (Figura 5), verificou-se redução expressiva dos componentes de produção medidos de todos os tratamentos (Figura 10), sendo tanto maior quanto mais precocemente as plantas-teste foram expostas à inoculação, o que está de acordo com estudo prévio (Hruska and Peralta 1997), e converge com estudo realizado com *S. kunkelii* (Massola et al. 1999a). Ainda que não tenha sido associado estatisticamente à densidade populacional de cigarrinhas, houve clara tendência de maior porcentagem de danos em plantas inoculadas por maior população de cigarrinhas, conforme observado em estudo anterior (Toffanelli and Bedendo 2002). Esse resultado reforça a explicação anterior

de que plantas expostas à população elevada de cigarrinhas infectivas também recebe uma carga maior do patógeno, com implicações na severidade da doença. Tal pressuposição se sustenta pelo fato de que não houve dano direto das cigarrinhas, conforme já relatado (Toffanelli and Bedendo 2002).

Os resultados dos testes de transmissão indicaram que o período latente do fitoplasma do milho, que compreende o tempo entre a inoculação e infecciosidade do hospedeiro (Rimbaud et al. 2015), não foi afetado pelo estágio que a planta-fonte foi exposta à inoculação, independentemente da população de cigarrinhas. Consequentemente, a proporção de eventos bem-sucedidos de inoculação por *D. maidis* não diferiu significativamente entre tratamentos. Dado que o potencial de inóculo das plantas-fonte foi avaliado apenas em um período, 4 semanas depois da inoculação, não é possível afirmar se os fatores testados afetariam a capacidade de transmissão do fitoplasma por *D. maidis* a partir de plantas com períodos distintos pós-inoculação. Sobre isso, foi demonstrado que o período latente do fitoplasma é bem menor do que o período de incubação, ≈ 13 vezes menos (Gonzalez et al. 2018), sendo obtido uma taxa de transmissão de 40% a partir de plantas-fonte com 3 dias pós-inoculação. Esses resultados sugerem elevada taxa de multiplicação do fitoplasma já nos primeiros dias pós-inoculação, assim como já relatado para outros fitoplasmas (Wei et al. 2004; Saracco et al. 2006). Considerando que o período latente médio do fitoplasma em *D. maidis* é de ≈ 3 semanas (25°C) (Moya-Raygoza and Nault 1998), coletivamente os resultados sugerem que podem ocorrer ciclos de dispersão secundária do fitoplasma em um único ciclo da cultura, o que seria consistente com doença policíclica (Bergamin-Filho et al. 2016).

O fato de que plantas inoculadas no estágio vegetativo mais avançado contribui como fonte de inóculo do fitoplasma ($\approx 77\%$ de transmissão - estágio V9) é particularmente importante, podendo ter implicações diferentes na disseminação da doença. Isso porque, plantas inoculadas neste estágio desenvolvem uma infecção latente, e plantas assintomáticas podem afetar o comportamento de *D. maidis*, tendendo a favorecer aspectos bioecológicos que propiciam a disseminação do fitoplasma (Gonzalez et al. 2018). Ao mesmo tempo, conhecendo o padrão epidemiológico da doença e o período crítico da cultura, é pouco provável que a disseminação do fitoplasma a partir dessa fonte de inóculo possa resultar em maiores danos na mesma área/talhão. Isso porque, o período compreendido desde a emergência da planta até a sua inoculação, mais a latência do fitoplasma na planta e

depois na cigarrinha, é relativamente longo, ultrapassando o período de maior vulnerabilidade da planta à infecção, como demonstrado aqui. Adicionalmente, o uso combinado de tratamento de sementes e pulverizações com produtos químicos tende a reduzir o dano potencial da disseminação secundária do fitoplasma (Bedendo and Lopes 2019).

Por outro lado, considerando que *D. maidis* emigra de áreas com plantas mais velhas para áreas recém estabelecidas (Oliveira et al. 2013), a referida fonte de inóculo do fitoplasma pode ter um papel importante na disseminação primária da doença (Oliveira et al. 2002; Canale et al. 2018), por promover maior proporção de cigarrinhas infectivas. Postula-se que quanto maior a população do inóculo do fitoplasma e da cigarrinha-do-milho, maior será a frequência de cigarrinhas infectivas. Isso pode explicar, por exemplo, a elevada incidência dos enfezamentos do milho na segunda safra “safrinha” (Coelho et al. 2017). É importante notar que, a alta incidência dos enfezamentos é frequentemente associada à presença de populações elevadas de *D. maidis* (Oliveira et al. 1998), mas também a população que de fato tem potencial de transmitir os mollicutes (Hruska et al. 1996; Massola et al. 1999a), ou seja, a população de cigarrinhas infectivas.

De modo geral, os resultados sugerem que a utilização de híbridos tolerantes é importante no manejo do enfezamento vermelho, pois além de reduzir a frequência de plantas infectadas, o que ajuda a diminuir o potencial de inóculo do patógeno, também reduziu a severidade da doença e, por consequência, os danos à produção. De acordo com Vale et al. (2001), a redução do inóculo de fitopatógenos pode ser relevante tanto por reduzir a gravidade da doença quanto por mitigar a taxa de progresso de epidemias. Nossos resultados indicaram, ainda, que a efetividade da infecção do fitoplasma nos estádios vegetativos mais avançados da cultura do milho pode aumentar não apenas os danos à produção, mas também o potencial de inóculo, o que pode ter implicações na disseminação da doença para novos cultivos. Esse resultado é particularmente importante, pois a eficácia do controle químico da cigarrinha-do-milho é restrita há alguns dias depois da germinação da planta (Oliveira et al. 2007), tornando os estádios subsequentes mais propensos à infecção pelo fitoplasma.

6. CONCLUSÃO

- Quanto mais precocemente a planta de milho for exposta à inoculação pelo fitoplasma do milho, maior a incidência e severidade de enfezamento vermelho e redução de produção, sendo que o nível de perdas depende diretamente da incidência da doença.
- Elevadas populações infectivas de *D. maidis* implicam em maiores incidências de infecção pelo fitoplasma e redução da produção.
- O uso de híbrido tolerante reduz a incidência de plantas infectadas pelo fitoplasma, severidade da doença e danos resultantes.
- Plantas inoculadas em estádios vegetativos mais desenvolvidos (V9) contribuem como fonte de inóculo do fitoplasma, já que a aquisição do patógeno e eficiência de transmissão por *D. maidis* não é afetada pelo estágio em que a planta-fonte foi submetida à inoculação ou pela densidade populacional de cigarrinhas infectivas à qual foi exposta.

REFERÊNCIAS

- Agrios, G.N. 2005. Genetics of plant disease. In *Plant Pathology*, Elsevier, p. 124–174.
- Alvizatos, A. S., and Markham, P. G. 1986. Acquisition and transmission of corn stunt spiroplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. *Annals of Applied Biology*. 108:535–544.
- Ammar, E. D., Fulton, D., Bai, X., Meulia, T., and Hogenhout, S. A. 2004. An attachment tip and pili-like structures in insect- and plant-pathogenic spiroplasmas of the class *Mollicutes*. *Archives of Microbiology*. 181:97–105.
- Ammar, E. D., and Hogenhout, S. A. 2005. Use of immunofluorescence confocal laser scanning microscopy to study distribution of the bacterium corn stunt spiroplasma in vector leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) and in host plants. *Annals of the Entomological Society of America*. 98:820–826.
- Ammar, E. D., Gasparich, G. E., Hall, D. G., and Hogenhout, S. A. 2011. Spiroplasma-like organisms closely associated with the gut in five leafhopper species (Hemiptera: Cicadellidae). *Archives of Microbiology*. 193:35–44.
- Bahia-Filho, A. F. C., Garcia, J. C., Parentoni, S. N., Santana, D. P., Cruz, J. C., and Schaffert, R. E. 2008. Impulsionando a produção e a produtividade de milho e sorgo, no Brasil. In *Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas*, eds. Albuquerque, A. C. S., and Silva, A. G. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 125–162.
- Bai, X., and Hogenhout, S. A. 2002. A genome sequence survey of the mollicute corn stunt spiroplasma *Spiroplasma kunkelii*. *FEMS Microbiology Letters*. 210:7–17.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., and Hogenhout, S. A. 2006. Living with Genome Instability: the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts. *Journal of Bacteriology*. 188:3682–3696.
- Ballinger, M. J., and Perlman, S. J. 2019. The defensive Spiroplasma. *Current Opinion in Insect Science*. 32:36–41.
- Barros, T. S. L., Davis, R. E., Resende, R. O., and Dally, E. L. 2001. Design of a Polymerase Chain Reaction for Specific Detection of Corn Stunt Spiroplasma. *Plant Disease*. 85:475–480.
- Bedendo, I. P., and Lopes, J. R. S. 2019. Impact and Management of Major Phytoplasma Diseases in Brazil. In *Sustainable Management of Phytoplasma Diseases in Crops Grown in the Tropical Belt: Biology and Detection*, eds. Olivier, C. Y., Dumonceaux, T. J., and Pérez-López, E. Springer, Cham, p. 251–268.

- Bergamin-Filho, A., Inoue-Nagata, A. K., Bassanezi, R. B., Belasque, J., Amorim, L., Macedo, M. A., Barbosa, J. C., Willocquet, L., and Savary, S. 2016. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. *Food Security*. 8:221–238.
- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., and Contaldo, N. 2014. Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences*. 05:1763–1788.
- Bertaccini, A., and Lee, I. M. 2018. Phytoplasmas: An Update. In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - I Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma - Associated Diseases*, eds. Bertaccini, A., Oshima, K., Kube, M., and Rao, G. P. Singapore: Springer, p. 1–29.
- Bové, J. M. 1997. Spiroplasmas: infectious agents of plants, arthropods and vertebrates - PubMed. *Wien Klin Wochenschr*. 109:604–612.
- Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L. J., and Sessitsch, A. 2017. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annual Review of Phytopathology*. 55:61–83.
- Bradfute, O. E. 1981. Corn Stunt Spiroplasma and Viruses Associated with a Maize Disease Epidemic in Southern Florida. *Plant Disease*. 65:837–841.
- Cacciola, S. O., Bertaccini, A., Pane, A., and Furneri, P. M. 2017. *Spiroplasma* spp.: A Plant, Arthropod, Animal and Human Pathogen. In *Citrus Pathology*, eds. Gill, H., and Garg, H. Rijeka: InTech, p. 31–51.
- Canale, M. C., Lopes, J. R. S., Nesi, C. N., and Prado, S. S. 2018. Role of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) gender on maize bushy stunt phytoplasma transmission. *Phytopathogenic Mollicutes*. 8:32–39.
- Carle, P., Saillard, C., Carrère, N., Carrère, S., Duret, S., Eveillard, S., Gaurivaud, P., Gourgues, G., Gouzy, J., Salar, P., Verdin, E., Breton, M., Blanchard, A., Laigret, F., Bové, J. M., Renaudin, J., and Foissac, X. 2010. Partial chromosome sequence of *Spiroplasma citri* reveals extensive viral invasion and important gene decay. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:3420–3426.
- Carlioni, E., Virla, E., Paradell, S., Carpane, P., Nome, C., Laguna, I., Pecci, M. P. G. 2011. *Exitianus obscurinervis* (Hemiptera: Cicadellidae), a New Experimental Vector of *Spiroplasma kunkelii*. *Journal of Economic Entomology*. 104:1793–1799.
- Chang, S. H., Tan, C. M., Wu, C. T., Lin, T. H., Jiang, S. Y., Liu, R. C., Tsai, M. C., Su, L.W., and Yang, J.Y. 2018. Alterations of plant architecture and phase transition by the phytoplasma virulence factor SAP11. *Journal of Experimental Botany*. 69:5389–5401.
- Chen, A., and Liao, C. H. 1975. Corn Stunt Spiroplasma: Isolation, Cultivation, and Proof of Pathogenicity. *Science*. 188:1015–1017.

Coelho, A. M., Landau, E. C., and Sabato, E. O. 2017. Época de semeadura do milho e incidência de doenças causadas por mollicutes. In Doenças do milho: Insetos-vetores, mollicutes e vírus, eds. Oliveira, C. M., and Sabato, E. O. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 200–213.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2020. Available at: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. [Accessed in October 2020].

Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltonieri, S., Windsor, H. M., Windsor, G. D. 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*. 51:607–617.

Contaldo, N., D’Amico, G., Paltrinieri, S., Diallo, H. A., Bertaccini, A., and Rosete, Y. A. 2019. Molecular and biological characterization of phytoplasmas from coconut palms affected by the lethal yellowing disease in Africa. *Microbiological Research*. 223–225:51–57.

Contaldo, N., Satta, E., Zambon, Y., Paltrinieri, S., and Bertaccini, A. 2016. Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. *Journal of Microbiological Methods*. 127:105–110.

Cruz, J. C., Filho, I. A. P., and Simão, E. P. 2014. 478 Cultivares de Milho estão Disponíveis no Mercado de Sementes do Brasil para a Safra 2014/15. Sete lagoas: Embrapa Milho e Sorgo (documento técnico, 167). 1:1-35.

Davis, R. E. 1973. Spiroplasma: Motile, Helical Microorganism Associated with Corn Stunt Disease. *Phytopathology*. 63:403–408.

Davis, R. E., Shao, J., Dally, E. L., Zhao, Y., Gasparich, G. E., Gaynor, B. J., Athey, J. C., Harrison, N. A., and Donofrio, N. 2015. Complete Genome Sequence of *Spiroplasma kunkelii* Strain CR2-3x, Causal Agent of Corn Stunt Disease in *Zea mays* L. *Genome Announcements*. 3:e01216-15.

Davis, R. E., Shao, J., Zhao, Y., Gasparich, G. E., Gaynor, B. J., and Donofrio, N. 2017. Complete Genome Sequence of *Spiroplasma citri* Strain R8-A2T, Causal Agent of Stubborn Disease in Citrus Species. *Genome Announcements*. 5:10–11.

Davis, R. E., Shao, J., Zhao, Y., Wei, W., Bottner-Parker, K., Silver, A., Stump, Z., Gasparich, G.E., and Donofrio, N. 2019. Complete Genome Sequence of *Spiroplasma phoeniceum* Strain P40T, a Plant Pathogen Isolated from Diseased Plants of Madagascar Periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. *Microbiology Resource Announcements*. 8:e01612-18.

Dermastia, M. 2019. Plant Hormones in Phytoplasma Infected Plants. *Frontiers in Plant Science*. 10:1–15.

Develey-Rivière, M. P., and Galiana, E. 2007. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytologist*. 175:405–416.

Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., and Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PLT grouplike microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. *Annals Phytopathological Society of Japan*. 33:259–266.

Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry bulletin*. 19:11–15.

Economou, A. 1999. Following the leader: Bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends in Microbiology*. 7:315–320.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2018. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. [Accessed in October 2020].

Fletcher, J., Melcher, U., and Wayadande, A. 2006. The Phytopathogenic Spiroplasmas. In *The Prokaryotes*, eds. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., and Stackebrandt, E. New York: Springer, p. 905–947.

Foissac, X., Bové, J. M., and Saillard, C. 1997. Sequence Analysis of *Spiroplasma phoeniceum* and *Spiroplasma kunkelii* Spiralin Genes and Comparison with Other Spiralin Genes. *An International Journal*. 35:240–243.

Fu, Z. Q., and Dong, X. 2013. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology*. 64:839–863.

Galvão, S. R. 2019. Enfezamentos do milho: incidência do fitoplasma e espiroplasma, dinâmica populacional, expressão de sintomas e caracterização molecular do fitoplasma com base no gene SecY. Tese (doutorado em Fitopatologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba.

Galvão, S. R., Sabato, E. O., and Bedendo, I. P. 2020. Occurrence and distribution of single or mixed infection of phytoplasma and spiroplasma causing corn stunting in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. 45:1–4.

Gasparich, G. E. 2010. Spiroplasmas and phytoplasmas: Microbes associated with plant hosts. *Biologicals*. 38:193–203.

Gonzalez, J. G., Jaramillo, M. G., and Lopes, J. R. S. 2018. Undetected Infection by Maize Bushy Stunt Phytoplasma Enhances Host-Plant Preference to *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Environmental Entomology*. 47:396–402.

González, J. G., Tanaka, F. A. O., and Lopes, J. R. S. 2016. First findings in the route of the maize bushy stunt phytoplasma within its vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*. 109:966–968.

Gosavi, G., Yan, F., Ren, B., Kuang, Y., Yan, D., Zhou, X., and Zhou, H. 2020. Applications of CRISPR technology in studying plant-pathogen interactions: overview and perspective. *Phytopathology Research*. 2:1–9.

Gussie, J. S., Fletcher, J., and Claypool, P. L. 1995. Movement and multiplication of *Spiroplasma kunkelii* in corn. *Phytopathology*. 85:1093–1098.

Hanway, J. 1966. How a corn plant develops. Iowa State University, Cooperative Extension Service, Ames, IA. Special Report. 48:1–18.

Hayward, A. C. 1974. Latent Infections by Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 12:87–97.

Hogenhout, S. A., and Loria, R. 2008. Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*. 11:449–456.

Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., and Namba, S. 2008. Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*. 9:403–423.

Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsua, K., Kagiwadab, S., Yamajia, Y., and Namba, S. 2009. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:6416–6421.

Hruska, A. J., Gladstone, S. M., and Obando, R. 1996. Epidemic roller coaster: Maize stunt disease in Nicaragua. *American Entomologist*. 42:248–252.

Hruska, A. J., and Peralta, M. G. 1997. Maize Response to Corn Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) Infestation and Achaparramiento Disease. *Journal of Economic Entomology*. 90:604–610.

Hu, L., and Yang, L. 2019. Time to Fight: Molecular Mechanisms of Age-Related Resistance. *Phytopathology*. 109:1500–1508.

Huang, W., Reyes-Caldas, P., Mann, M., Seifbarghi, S., Kahn, A., Almeida, R. P. P., Béven, L., Heck, M., Hogenhout, S.A., and Coaker, G. 2020. Bacterial Vector-Borne Plant Diseases: Unanswered Questions and Future Directions. *Molecular Plant*. 13:1379–1393.

IRPCM. 2004. “*Candidatus* Phytoplasma”, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54:1243–1255.

Iwabuchi, N., Maejima, K., Kitazawa, Y., Miyatake, H., Nishikawa, M., Tokuda, R., Hiroaki, K., Akio, M., Takamichi, N., Kenro, O., Yasuyuki, Y., and Namba, S. 2019. Crystal structure of phyllogen, a phyllody-inducing effector protein of phytoplasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 513:952–957.

- Jones, T. K. L., and Medina, R. F. 2020. Corn stunt disease: An ideal insect–microbial–plant pathosystem for comprehensive studies of vector-borne plant diseases of corn. *Plants*. 9:1–15.
- Junqueira, A., Bedendo, I., and Pascholati, S. 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65:181–185.
- Junqueira, A. C. B., Bedendo, I. P., and Pascholati, S. F. 2011. Effect of phytoplasma infection on the activity of peroxidase, β -1,3 glucanase and chitinase in corn plants. *Summa Phytopathologica*. 37:194–198.
- Jurga, M., and Zwolińska, A. 2020. Phytoplasmas in Poaceae species: a threat to the most important cereal crops in Europe. *Journal of Plant Pathology*. 102:287–297.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S. I., Ugaki, M., and Namba, S. Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14:1043–1050.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S. I., Ugaki, M., and Namba, S. 2004. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 150:135–142.
- Koinuma, H., Maejima, K., Tokuda, R., Kitazawa, Y., Nijo, T., Wei, W., Kumita, K., Akio M., Namba, S., and Yamaji, Y. 2020. Spatiotemporal dynamics and quantitative analysis of phytoplasmas in insect vectors. *Scientific Reports*. 10:1–13.
- Kube, M., Duduk, B., and Oshima, K. 2019. Genome Sequencing. In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - III*, eds. Bertaccini, A., Oshima, K., Kube, M., and Rao, G. P. Singapore: Springer, p. 1–16.
- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R., and Seemüller, E. 2012. Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism. *The Scientific World Journal*. 2012:1–25.
- Kumari, S., Nagendran, K., Rai, A. B., Singh, B., Rao, G. P., and Bertaccini, A. 2019. Global Status of Phytoplasma Diseases in Vegetable Crops. *Frontiers in Microbiology*. 10:1–15.
- Kus, J. V, Zaton, K., Sarkar, R., and Cameron, R. K. 2002. Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell*. 14:479–490.
- Larsen, K. J., Nault, L. R., and Moya-Raygoza, G. 1992. Overwintering biology of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae): adult populations and drought hardiness. *Environmental Entomology*. 21:566–577.

Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bartoszyk, M., Laboratoryz, B., and Arsi Beltsville, U. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16s rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48:1153-1169.

Lee, I. M., Davis, R. E., and Gundersen-Rindal, D. E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology*. 54:221–255.

Lee, I. M., Zhao, Y., and Bottner, K. D. 2006. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes*. 20:87–91.

Leisner, S. M., Turgeon, R., and Howell, S. H. 1993. Effects of host plant development and genetic determinants on the long-distance movement of cauliflower mosaic virus in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 5:191–202.

Liao, C. H. 1977. Culture of Corn Stunt Spiroplasma in a Simple Medium. *Phytopathology*. 77:802-807.

Lopes, J. R. S., Daugherty, M. P., and Almeida, R. P. P. 2010. Strain origin drives virulence and persistence of *Xylella fastidiosa* in alfalfa. *Plant Pathology*. 59:963–971.

MacLean, A. M., and Hogenhout, S. A. 2012. Phytoplasmas and Spiroplasmas: The Phytopathogenic Mollicutes of the Phloem. In *Phloem: Molecular Cell Biology, Systemic Communication, Biotic Interactions*, eds. Thompson, G. A., and Van Bel, A. J. E. Ames, IA: Wiley-Blackwell, p. 293–309.

Madden, L. V., and Nault, L. R. 1983. Differential pathogenicity of corn stunting mollicutes to leafhopper vectors in *Dalbulus* and *Baldulus* species. *Phytopathology*. 73:1608–1614.

Maejima, K., Oshima, K., and Namba, S. 2014. Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology*. 80:210–221.

Markham, P. G., Townsend, R., Bar-Joseph, M., Daniels, M. J., Plaskitt, A., and Meddins, B. M. 1974. Spiroplasmas are the causal agents of citrus little-leaf disease. *Annals of Applied Biology*. 78:49–57.

Massola, N. S., Bedendo, I. P., Amorim, L., and Lopes, J. R. S. 1999a. Effects on the inoculation time on corn with *Spiroplasma kunkelii* on yield components. *Fitopatologia Brasileira*. 24:571–573.

Massola, N. S., Bedendo, I. P., Amorim, L., and Lopes, J. R. S. 1999b. Quantificação de danos causados pelo enfezamento vermelho e pálido do milho em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira*. 24:136–142.

Mendiburu, F. 2020. Statistical Procedures for Agricultural Research: Package ‘agricolae’ (version 1.3-3). 155p.

Meneses, A. R., Querino, R. B., Oliveira, C. M., Maia, A. H. N., and Silva, P. R. R. 2016. Seasonal and Vertical Distribution of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) in Brazilian Corn Fields. *Florida Entomologist*. 99:750–754.

Miché, L., Battistoni, F., Gemmer, S., Belghazi, M., and Reinhold-Hurek, B. 2018. Host-dependent expression of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae hydrogenase is controlled at transcriptional and post-transcriptional levels in legume nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19:115–122.

Minato, N., Himeno, M., Hoshi, A., Maejima, K., Komatsu, K., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Yusa, A., Yamaji, Y., Oshima, O., Kamiya, Y., and Namba, S. 2014. The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Scientific Reports*. 4:1–7.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT). 2020. Available at: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. [Accessed in October 2020].

Moral, R. A., Hinde, J., and Demétrio, C. G. B. 2017. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. *Journal of Statistical Software*. 81: 1-23.

Moya-Raygoza, G., and Nault, L. R. 1998. Transmission Biology of Maize Bushy Stunt Phytoplasma by the Corn Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 91:668–676.

Moya-Raygoza, G., Hogenhout, S. A., and Nault, L. R. 2007. Habitat of the corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) during the dry (winter) season in Mexico. *Environmental Entomology*. 36:1066–1072.

Moya-Raygoza, G., Palomera-Avalos, V., and Galaviz-Mejia, C. 2007. Field overwintering biology of *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) and its vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Annals of Applied Biology*. 151:373–379.

Murrall, D. J., Nault, L. R., Hoy, C. W., Madden, L. V., and Miller, S. A. 1996. Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*. 89:1223–1232.

Musetti, R. 2009. Biochemical Changes in Plants Infected by Phytoplasmas. In *Phytoplasmas Genomes, Plant Hosts and Vectors*, eds. Weintraub, P.G., and Jones. P. Wallingford, UK: CAB International. p. 132–146.

NAMBA, S. 2019. Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 95:401–418.

Nault, L. R. 1980. Maize Bushy Stunt and Corn Stunt: A Comparison of Disease Symptoms, Pathogen Host Ranges, and Vectors. *Phytopathology*. 70:659-662.

- Nault, L. R., and Delong, D. M. 1980. Evidence for Co-evolution of Leafhoppers in the Genus *Dalbulus* (Cicadellidae: Homoptera) with Maize and Its Ancestors. *Annals of the Entomological Society of America*. 73:349–353.
- Nault, L. R. 1990. Evolution of an insect pest: maize and the corn leafhopper, a case study. *Maydica*. 35:165–175.
- Nieuwenhove, G. A. Van, Frías, E. A., and Virla, E. G. 2016. Effects of temperature on the development, performance and fitness of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* (DeLong) (Hemiptera: Cicadellidae): Implications on its distribution under climate change. *Agricultural and Forest Entomology*. 18:1–10.
- Oleszczuk, J. D., Catalano, M. I., Dalaisón, L., Rienzo, J. A., Pecci, M. P. G., and Carpane, P. 2020. Characterization of components of resistance to Corn Stunt disease. *PLOS ONE*. 15:1–17.
- Oliveira, C. M., Molina, R. M. S., Albres, R. S., and Lopes, J. R. S. 2002. Disseminação de mollicutes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Fitopatologia Brasileira*. 27:91–95.
- Oliveira, C. M., and Lopes, J. R. S. 2004. Técnicas para a criação da cigarrinha-do-milho e inoculação de mollicutes e vírus em plantas. In *Doenças do milho: Mollicutes, Vírus, Vetores e Mancha por Phaeosphaeria*, eds. Oliveira, C.M., and Oliveira, E. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. p. 90–116.
- Oliveira, C. M., Oliveira, E., Canuto, M., and Cruz, I. 2007. Controle químico da cigarrinha-do-milho e incidência dos enfezamentos causados por mollicutes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 42:297–303.
- Oliveira, C. M., Lopes, J. R. S., and Nault, L. R. 2013. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 147:141–153.
- Oliveira, C. M., Oliveira, E., Souza, I. R. P., Alves, E., Dolezal, W., Paradell, S., Lenicov, A. M. M. R., and Frizzas, M. R. 2013. Abundance and Species Richness of Leafhoppers and Planthoppers (Hemiptera: Cicadellidae and Delphacidae) in Brazilian Maize Crops. *Florida Entomologist*. 96:1470–1481.
- Oliveira, C. M., Querino, R. B., and Frizzas, M. R. 2017. Cigarrinhas na cultura do milho no Brasil. In *Doenças do milho: Insetos-vetores, mollicutes e vírus*, eds. Oliveira, C. M., and Sabato, E. O. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. p. 72–96.
- Oliveira, C. M., Lopes, J. R. S., and Querino, R. B. 2017. Técnicas de criação da cigarrinha-do-milho para estudos de transmissão e de controle biológico. eds. Oliveira, C. M., and Sabato, E. O. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. p. 156-178.

- Oliveira, C. M., Frizzas, M. R., and Oliveira, E. 2020. Overwintering plants for *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) adults during the maize off-season in central Brazil. *International Journal of Tropical Insect Science*. 40:1105–1111.
- Oliveira, E., Waquil, J. M., Fernandes, F. T., Paiva, E., Resende, R. O., and Kitajima, E. W. 1998. "Enfezamento pálido" e "enfezamento vermelho" na cultura do milho no Brasil Central. *Fitopatologia Brasileira*. 23:45–47.
- Oliveira, E., Oliveira, C. M., Souza, I. R. P., Magalhães, P. C., and Cruz, I. 2002. Enfezamentos em Milho: Expressão de Sintomas Foliares, Detecção dos Molicutes e Interações com Genótipos. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 1:53–62.
- Oliveira, E., Carvalho, R. V., Duarte, A. P., Andrade, R. A., Resende, R. O., Oliveira, C. M., and Recco, P. C. 2002. Molicutes e Vírus em Milho na Safrinha e na Safra de Verão. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 1:38–46.
- Oliveira, E., Resende, R. D. O., Pecci, M. P. G., Laguna, I. G., Herrera, P., and Cruz, I. 2003. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por molicutes em milho no Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38:19–25.
- Oliveira, E., Oliveira, C. M., Magalhães, P. C., Andrade, C. L. T., and Hogenhout, A. S. 2005. Spiroplasma and phytoplasma infection reduce kernel production, and nutrient and water contents of several but not all maize cultivars. *Maydica*. 50:171–178.
- Oliveira, E., Ternes, S., Vilamiu, R., Landau, E. C., and Oliveira, C. M. 2015. Abundance of the insect vector of two different Mollicutes plant pathogens in the vegetative maize cycle. *Phytopathogenic Mollicutes*. 5:S117–S118.
- Orlovskis, Z., Canale, M. C., Thole, V., Pecher, P., Lopes, J. R. S., and Hogenhout, S. A. 2015. Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. *Current Opinion in Insect Science*. 9:16–23.
- Orlovskis, Z., and Hogenhout, S. A. 2016. A Bacterial Parasite Effector Mediates Insect Vector Attraction in Host Plants Independently of Developmental Changes. *Frontiers in Plant Science*. 7:1–9.
- Orlovskis, Z., Canale, M. C., Haryono, M., Lopes, J. R. S., Kuo, C. H., and Hogenhout, S. A. 2017. A few sequence polymorphisms among isolates of Maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Annals of Botany*. 119:869–884.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S. I., Ugaki, M., and Shigetou Namba, S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*. 36:27–29.

Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Ishii, Y., Hoshi, A., Hayashi, Y., Kagiwada, S., and Namba, S. 2007. Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of *Candidatus Phytoplasma asteris*. *Molecular Plant Pathology*. 8:481–489.

Oshima, K., Maejima, K., and Namba, S. 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*. 4:1–8.

Paolacci, A. R., Catarcione, G., Ederli, L., Zadra, C., Pasqualini, S., Badiani, M., Musetti, R., Santi, S., and Ciaffi, M. 2017. Jasmonate-mediated defence responses, unlike salicylate-mediated responses, are involved in the recovery of grapevine from bois noir disease. *BMC Plant Biology*. 17:118.

Pecher, P., Moro, G., Canale, M. C., Capdevielle, S., Singh, A., MacLean, A., Sugio, A., Kuo, C. H., Lopes, J. R. S., and Hogenhout, S. A. 2019. Phytoplasma SAP11 effector destabilization of TCP transcription factors differentially impact development and defence of Arabidopsis versus maize. *PLoS Pathogens*. 15:1–27.

Purcell, A. H. 1982. Insect Vector Relationships with Procaryotic Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 20:397–417.

R Core Team. 2019. Uma linguagem e ambiente para computação estatística. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria. Available at: <https://www.r-project.org/> [Accessed March 18, 2019].

Raiesi, T., and Golmohammadi, M. 2020. Changes in nutrient concentrations and biochemical characteristics of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) infected by phytoplasma. *Journal of General Plant Pathology*. 86:486–493.

Rashed, A., Nash, T. D., Paetzold, L., Workneh, F., and Rush, C. M. 2012. Transmission efficiency of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” and potato zebra chip disease progress in relation to pathogen titer, vector numbers, and feeding sites. *Phytopathology*. 102:1079–1085.

Regras para análise de sementes (RAS). 2009. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 399p.

Rimbaud, L., Dallot, S., Delaunay, A., Borron, S., Soubeyrand, S., Thébaud, G., and Jacquot, E. 2015. Assessing the mismatch between incubation and latent periods for vector-borne diseases: The case of sharka. *Phytopathology*. 105:1408–1416.

Sabato, E. O. 2017. Enfezamentos do milho. In *Doenças do milho: Insetos-vetores, mollicutes e vírus*, eds. Oliveira, C. M., and Sabato, E. O. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. p. 12–24.

Sabato, E. O., Landau, E. C., Barros, B. A., and Oliveira, C. M. 2020. Differential transmission of phytoplasma and spiroplasma to maize caused by variation in the environmental temperature in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. 157:163–171.

- Saglio, P., Lhospital, M., Dupont, G., Bové, J. M., Tully, J. G., and Freundt, E. A. 1973. *Spiroplasma citri* gen. and sp. n.: a Mycoplasma-Like Organism Associated with “Stubborn” Disease of Citrus. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 23: 191-204
- Saigo, M., Golic, A., Alvarez, C. E., Andreo, C. S., Hogenhout, S. A., Mussi, M. A., and Drincovich, M. F. 2014. Metabolic regulation of phytoplasma malic enzyme and phosphotransacetylase supports the use of malate as an energy source in these plant pathogens. *Microbiology*. 160:2794–2806.
- Saillard, C., Vignault, J. C., Bové, J. M., Raie, A., Tully, J. G., Williamson, D. L., Fos, A., Garnier, M., Gadeau, A., Carle, P., and Whitcomb, R. F. 1987. *Spiroplasma phoeniceum* sp. nov. a New Plant-Pathogenic Species from Syria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37: 106-115.
- Santana, P. A., Kumar, L., Da Silva, R. S., Pereira, J. L., and Picanço, M. C. 2019. Assessing the impact of climate change on the worldwide distribution of *Dalbulus maidis* (DeLong) using MaxEnt. *Pest Management Science*. 75:2706–2715.
- Saracco, P., Bosco, D., Veratti, F., and Marzachi, C. 2006. Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant *Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insect vector P. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 67:212–219.
- Scott, G. E., Rosenkranz, E. E., and Nelson, L. R. 1977. Yield Loss of Corn Due to Corn Stunt Disease Complex. *Agronomy Journal*. 69:92–94.
- Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., Van Den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R., and Kuhn, A. 2004. *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO Journal*. 23:294–301.
- Shiferaw, B., Prasanna, B. M., Hellin, J., and Bänziger, M. 2011. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security*. 3:307–327.
- Silveira, C. H. 2019. Eficácia de inseticidas no controle de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) e da transmissão de espiroplasma do milho. Dissertação (mestrado em Entomologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba.
- Silveira, F. T., Moro, J. R., Silva, H. P., Oliveira, J. A., and Perecin, D. 2008. Herança da resistência ao enfezamento em milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43:1717–1723.
- Stavrínides, J., McCann, H. C., and Guttman, D. S. 2008. Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cellular Microbiology*. 10:285–292.

Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, Ç. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E., and Kirkpatrick, B. C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:2988–2993.

Sugio, A., and Hogenhout, S. A. 2012. The genome biology of phytoplasma: Modulators of plants and insects. *Current Opinion in Microbiology*. 15:247–254.

Sugio, A., MacLean, A. M., Kingdom, H. N., Grieve, V. M., Manimekalai, R., and Hogenhout, S. A. 2011. Diverse Targets of Phytoplasma Effectors: From Plant Development to Defense Against Insects. *Annual Review of Phytopathology*. 49:175–195.

Summers, C. G., Newton, A. S., and Opgenorth, D. C. 2004. Overwintering of Corn Leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), and *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) in California's San Joaquin Valley. *Environmental Entomology*. 33:1644–1651.

Tanumihardjo, S. A., McCulley, L., Roh, R., Lopez-Ridaura, S., Palacios-Rojas, N., and Gunaratna, N. S. 2020. Maize agro-food systems to ensure food and nutrition security in reference to the Sustainable Development Goals. *Global Food Security*. 25:1-9.

Teixeira, F. F., Costa, F. M., Sábato, E. O., Leite, C. E. P., Meirelles, W. F., Guimarães, C. T., Belicuas, S. N. J. 2013. Pré-melhoramento de milho quanto à resistência a enfezamentos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 48:51–58.

Teixeira, F. F., and Sabato, E. O. 2017. Resistência do milho aos enfezamentos causados por molicutes. In *Doenças do milho: Insetos-vetores, molicutes e vírus*, eds. Oliveira, C. M. and Sabato, E. O. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. p. 182–188.

Toffanelli, C. M., and Bedendo, I. P. 2001. Efeito da inoculação do fitoplasma do enfezamento sobre o desenvolvimento e produção de híbridos de milho. *Fitopatologia Brasileira*. 26:756–760.

Toffanelli, C. M., and Bedendo, I. P. 2002. Efeito da população infetiva de *Dalbulus maidis* na produção de grãos e no desenvolvimento de sintomas do enfezamento vermelho do milho. *Fitopatologia Brasileira*. 27:82–86.

Tomkins, M., Klot, A., Marée, A. F., and Hogenhout, S. A. 2018. A multi-layered mechanistic modelling approach to understand how effector genes extend beyond phytoplasma to modulate plant hosts, insect vectors and the environment. *Current Opinion in Plant Biology*. 44:39–48.

Toruño, T. Y., Stergiopoulos, I., and Coaker, G. 2016. Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annual Review of Phytopathology*. 54:419–441.

Triplehorn, B. W., and Nault, L. R. 1985. Phylogenetic Classification of the Genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and Notes on the Phylogeny of the Macrostelini. *Annals of the Entomological Society of America*. 78:291–315.

United States Department of Agriculture (USDA). 2020. Available at: <https://www.fas.usda.gov/commodities>. [Accessed in October 2020].

Vale, F. X. R., Parlevliet, J. E., and Zambolim, L. 2001. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*. 26:577–589.

Van Bel, A. J. E., and Musetti, R. 2019. Sieve element biology provides leads for research on phytoplasma lifestyle in plant hosts. *Journal of Experimental Botany*. 70:3737–3755.

Waquil, J. M., Viana, P. A., Cruz, I., and Santos, J. P. 1999. Aspectos da biologia da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 28:413–420.

Wei, W., Kakizawa, S., Suzuki, S., Jung, H. Y., Nishigawa, H., Miyata, S. I., Oshima, K., Ugaki, M., Tadaaki, H., and Namba, S., 2004. In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology*. 94:244–250.

Weintraub, P. G., and Beanland, L. 2006. Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*. 51:91–111.

Whalen, M. C. 2005. Host defence in a developmental context. *Molecular Plant Pathology*. 6:347–360.

Whitcomb, R. F., Chen, T. A., and Williamson, D. L. 1986. *Spiroplasma kunkelii* sp. nov.: Characterization of the etiological agent of corn stunt disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36:170–178.

Williamson, D. L., and Whitcomb, R. F. 1975. Plant Mycoplasmas: A Cultivable Spiroplasma Causes Corn Stunt Disease. *Science*. 188:1018–1020.

Wise, K., Mueller, D., Sisson, A., Smith, D., Bradley, C., and Robertson, A. 2016. Foliar and Aboveground Diseases. In *A Farmer's Guide to Corn Diseases*, eds. Wise, K., Mueller, D., Sisson, A., Smith, D., Bradley, C., and Robertson, A. The American Phytopathological Society. p. 37–78.

Yan, C., and Xie, D. 2015. Jasmonate in plant defence: Sentinel or double agent? *Plant Biotechnology Journal*. 13:1233–1240.

Zahniser, J. N., and Dietrich, C. 2013. A review of the tribes of Deltocephalinae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae). *European Journal of Taxonomy*. 45:1–211.

Zhao, Y., and Davis, R. E. 2016. Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66:2121–2123.

Zhao, Y., Hammond, R. W., Jomantiene, R., Dally, E. L., Lee, I. M., Jia, H., Wu, H. Lin, S., Zhang, P., Kenton, S., Najar, F. Z., Hua, A., Roe, B. A., Fletcher, J. and Davis, R. E. 2003. Gene content and organization of an 85-kb DNA segment from the genome of the phytopathogenic mollicute *Spiroplasma kunkelii*. *Molecular Genetics and Genomics*. 269:592–602.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Efeitos da inoculação do fitoplasma do milho sobre a sintomatologia e produção de plantas de milho de dois híbridos com níveis de suscetibilidade a enfezamentos distintos, inoculadas em diferentes estádios (A). Plantas-teste do híbrido suscetível mostraram sintomas típicos, ou seja, avermelhamento generalizado de folhas evoluindo para a necrose dos bordos (B). Enquanto para plantas-teste do híbrido tolerante predominou o amarelecimento de folhas (C). O estádio vegetativo em que a planta-teste foi inoculada afetou a intensidade dos sintomas (B – plantas inoculadas no estádio V2 e D - plantas inoculadas no estádio V5, E- controle). Para os dois híbridos, houve um maior número de espigas por planta infectada (representação de plantas inoculadas no estádio V2: F - híbrido suscetível e G - híbrido tolerante, em relação ao controle – H), porém foram espigas anormais (por exemplo, I-1, J-1 e K-1). Quanto mais precocemente ocorreram as inoculações, maiores os danos no tamanho de espigas e de grãos: I-1 plantas inoculadas no estádio V2, I-2 controle; K-1 plantas inoculadas no estádio V5, K-2 controle; L-1 plantas inoculadas no estádio V9, L-2 controle; inclusive para o híbrido tolerante, J-1 plantas inoculadas, J-2 controle (estádio V2).

Fatores de variação		Híbrido suscetível							
		Parâmetros analisados							
		Prod./planta		Peso de grãos		Altura			
		<i>F</i>	<i>P</i> -valor	<i>F</i>	<i>P</i> -valor	<i>F</i>	<i>P</i> -valor		
Infecividade das cigarrinhas (I)	129.45	<0.001	201.53	<0.001	15.73	<0.001			
Estádios vegetativos (EV)	46.97	<0.001	71.54	<0.001	43.36	<0.001			
Densidade popul. (DP)	10.06	0.002	3.73	0.056	3.42	0.06			
I x EV	3.06	0.08	2.95	0.08	21.68	<0.001			
I x DP	0.52	0.47	4.03	0.04	2.14	0.14			
EVx DP	1.28	0.26	0.01	0.91	1.64	0.20			
I x EV x DP	0.37	0.54	0.46	0.49	3.38	0.06			
Fatores de variação		Híbrido tolerante							
		Parâmetros analisados							
		Prod./planta		Peso de grãos		Altura		Comp. de internódios	
		<i>F</i>	<i>P</i> -valor	<i>F</i>	<i>P</i> -valor	<i>F</i>	<i>P</i> -valor	<i>F</i>	<i>P</i> -valor
Infecividade das cigarrinhas (I)	1.20	0.31	15.62	<0.001	8.50	0.001	7.02	0.002	
Densidade popul. (DP)	3.91	0.057	0.84	0.36	1.41	0.24	1.62	0.21	
I x DP	0.10	0.74	0.28	0.60	0.007	0.93	0.001	0.97	

APÊNDICE B. Resultados das análises de variâncias testando os efeitos da inoculação do fitoplasma do milho em função de fatores da planta e do vetor *Dalbulus maidis*, assim como as interações de fatores. Valores de *P* em negrito denotam significância a 5%.