

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

**Características da transmissão do maize yellow mosaic virus (gênero
Polerovirus) por afídeos (Hemiptera: Aphididae) em milho (*Zea mays* L.)**

Caroline Ferreira Freire

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

**Piracicaba
2024**

Caroline Ferreira Freire
Bacharel em Engenharia Agrônoma
Características da transmissão do maize yellow mosaic virus (gênero *Polerovirus*) por
afídeos (Hemiptera: Aphididae) em milho (*Zea mays* L.)

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
2024

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

Freire, Caroline Ferreira

Características da transmissão de maize yellow mosaic virus (gênero: *Polyomavirus*) por afídeos (Hemiptera: Aphididae) em milho (*Zea mays* L.) / Caroline Ferreira Freire - - Piracicaba, 2024. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024

74 p.

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

1. Pulgão do milho 2. Doenças do milho 3. Relação patógeno-vetor I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ivanete e Milton Sérgio, que me deram suporte e amor em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a honra de estar vivendo este momento. Agradeço por Ele ter me capacitado e colocado em meu caminho pessoas que contribuíram das mais diversas formas para que essa dissertação fosse construída.

Aos meus pais, Ivanete e Milton Sérgio, que sempre me deram todo o apoio. Sempre confiaram em mim e no meu potencial. Sempre estiveram presentes em todas as minhas conquistas e momentos de decisão ou preocupação.

Ao prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, pela confiança e orientação. Pelas conversas e conselhos. Obrigada pela assistência e compreensão.

Ao Lucas Vicente, meu namorado, que nunca mediu esforços para me ajudar, com conversas, momentos de distração e apoio nos ensaios. Colocou a mão na massa e sacrificou dias de descanso para me apoiar nos ensaios. Obrigada pela parceria.

Aos meus colegas de laboratório, e amigos: Anderson Ramos, Euclides Vilanova e Joyce por todos os ensinamentos, trocas de experiência e parceria.

A minha estagiária preferida do laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, Maria Eduarda, que me deu todo o suporte desde que entrou no laboratório. Conduziu ensaios comigo e tomou grande responsabilidade nos meus momentos mais críticos.

Às minhas amigas de longa data e colegas de mestrado Mikaela, Larissa, Bruna e Jéssica pelo apoio contínuo desde a graduação.

Ao Roberto Carvalho, e empresa LongPing High-Technology, pelo apoio e fornecimento de material para ensaios, e, principalmente, pelas conversas e mentorias.

Ao Marcos Gonçalves, e ao Instituto Biológico, que cedeu espaço e abriu as portas para que eu pudesse treinar em seu laboratório rotinas que precisei incorporar na minha pesquisa.

À Regina de Carvalho, e a Adapar, por me auxiliar com a identificação de espécie de afídeos.

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia por todo suporte.

Ao órgão de fomento, CAPES, pelo auxílio financeiro e apoio científico.

“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”
Marie Curie

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Cultura do milho	17
2.2 Víroses.....	18
2.2.1 Víroses no milho	19
2.2.1.1 Potyvirus	20
2.2.1.2 Polerovirus	21
2.3 Afídeos vetores dos vírus para a espécie do milho	22
2.4 Estratégias de manejo no patossistema afídeo-milho-vírus	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Obtenção de plantas saudas.....	25
3.2. Obtenção de afídeos vetores.....	25
3.2.1 <i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch).....	25
3.2.2 <i>Rhopalosiphum padi</i> (Linnaeus) e <i>Schizaphis graminum</i> (Rondani).....	26
3.2.3 <i>Melanaphis sorghi</i> (Theobald).....	26
3.3. Obtenção do isolado viral e procedimentos gerais de transmissão	26
3.4. Caracterização da eficiência e persistência de transmissão de MaYMV por <i>R. maidis</i> 27	
3.4.1 Planta-fonte com infecção mista (MaYMV e SCMV).....	29
3.4.2 Planta-fonte com infecção simples de MaYMV	29
3.4.3 Planta-fonte com infecção simples por MaYMV e ausência/presença de infecção prévia por SCMV na planta-teste.....	29
3.4.4 Aquisição em planta-fonte com infecção mista, seguida ou não de etapa de limpeza viral	30
3.5. Transmissão de MaYMV por <i>R. maidis</i> para diferentes genótipos de milho e avaliação de sintomas.....	31
3.6. Transmissão de MaYMV por <i>R. maidis</i> para diferentes espécies de plantas	31
3.7. Eficiência de transmissão de MaYMV por diferentes espécies de afídeos.....	32
3.8. Eficiência de transmissão de MaYMV a partir de infecções mistas com outros vírus e/ou mollicutes em plantas de milho no campo	32
3.9. Detecção molecular de vírus nas plantas e afídeos	33
3.10. Análise dos resultados.....	35

4. RESULTADOS	37
4.1. Caracterização da eficiência e persistência de transmissão de MaYMV por <i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch)	37
4.1.1 Planta-fonte com infecção mista (MaYMV e SCMV)	37
4.1.2 Planta-fonte com infecção simples de MaYMV	38
4.1.3 Planta-fonte com infecção simples de MaYMV e ausência/presença de infecção prévia de SCMV em plantas-teste (inoculação mecânica)	39
4.1.4 Planta-fonte com infecção mista de MaYMV e SCMV e etapa de limpeza	41
4.2 Eficiência de transmissão de MaYMV por <i>R. maidis</i> em diferentes genótipos de milho e avaliação de sintomas	43
4.3 Eficiência de transmissão de MaYMV por <i>R. maidis</i> para diferentes espécies de plantas	46
4.4 Caracterização da eficiência de transmissão de MaYMV por diferentes espécies de afídeos	47
4.5 Eficiência de transmissão de MaYMV a partir infecções mistas com outros vírus e/ou mollicutes em plantas de milho no campo	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	63

RESUMO

Características da transmissão do maize yellow mosaic virus (gênero *Polerovirus*) por afídeos (Hemiptera: Aphididae) em milho (*Zea mays* L.)

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores e exportadores de grãos. A crescente demanda por este tipo de produto e o avanço em tecnologias permite que o país mantenha cultivo contínuo na maior parte das áreas agrícolas. Para a cultura do milho (*Zea mays*, L.), tem-se tornado comum encontrar, nos diferentes estados, de duas a três safras por ano. Porém, a promoção dessa “ponte verde”, aliada a outros fatores tem propiciado o aumento de pragas nas áreas agrícolas, incluindo os insetos vetores, que vêm recebendo maior destaque a cada ano. Além de danos diretos, os insetos vetores estão associados a danos indiretos, especialmente a transmissão de fitopatógenos. Nos últimos anos, o problema com vírus e mollicutes em milho tem-se agravado, que são transmitidos principalmente pela cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) e pelo pulgão-do milho, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch). Os patógenos transmitidos por *D. maidis* vêm sendo amplamente estudados, mas os vírus transmitidos por pulgões, tais como sugarcane mosaic virus (SCMV) e maize yellow mosaic virus (MaYMV), têm recebido pouco destaque, sendo que o último foi diagnosticado pela primeira vez no país em 2017, e ainda são escassas as pesquisas a respeito da sua transmissão e epidemiologia. Nesta pesquisa foram conduzidos ensaios visando caracterizar a transmissão do MaYMV quanto à persistência e eficiência de transmissão por *R. maidis*, além de investigar a possibilidade de transmissão por outros afídeos, e de infecção de outras duas espécies de gramíneas cultivadas, aveia (*Avena sativa* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench). Os resultados mostraram que MaYMV pode ser transmitido em milho por outros afídeos de diferentes gêneros, tais como *R. padi* (L.), *Schizaphis graminum* (Rondani) e *Melanaphis sorghi* (Theobald). A eficiência de transmissão de MaYMV é baixa, com probabilidade de transmissão por indivíduo estimada em cerca de 1%, por dia de acesso à inoculação. A espécie *R. maidis* retém MaYMV em seu organismo, bem como a capacidade de transmitir o vírus por pelo menos 5 dias, sem queda na eficiência de transmissão, o que caracteriza a transmissão como persistente circulativa. MaYMV pode ser transmitido por *R. maidis* a partir de plantas-fonte de milho com infecções mistas de SCMV, maize rayado fino virus (MRFV) e maize striate mosaic virus (MSMV). A transmissão de MaYMV para milho não é influenciada por uma infecção prévia de SCMV na planta recipiente. O isolado de MaYMV usado no presente estudo infectou milho e aveia, mas não sorgo; curiosamente, não mostrou sintomas aparentes em nenhum dos hospedeiros e genótipos de milho avaliados. Em suma, o presente trabalho gerou informações complementares importantes sobre as relações de MaYMV com afídeos vetores, plantas hospedeiras e outros vírus, particularmente SCMV.

Palavras-chave: Pulgão do milho, Doenças do milho, Relação patógeno-vetor

ABSTRACT

Transmission characteristics of maize yellow mosaic virus (genus *Polerovirus*) by aphids (Hemiptera: Aphididae) in maize (*Zea mays* L.)

Brazil stands out as a major producer and exporter of grains. The growing demand for this type of product and the advancement in technologies allow the country to maintain continuous cultivation in most agricultural areas. For the corn crop (*Zea mays* L.), it has become common to have, in different states, two or three harvests per year. However, the promotion of this “green bridge”, combined with some other factors, has led to an increase in pests in agricultural areas, among which insect vectors have been receiving greater attention each year. In addition to direct damage, insect vectors are associated with indirect damage, especially the transmission of plant pathogens. In recent years, the problem with maize viruses and mollicutes has worsened, which are mainly transmitted by the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) and by the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch). The pathogens transmitted by *D. maidis* have been widely studied, whereas the viruses transmitted by aphids, such as sugarcane mosaic virus (SCMV) and maize yellow mosaic virus (MaYMV) have received less attention, with one of them (MaYMV) being diagnosed for the first time in the Brasil in 2017, for which little is known on transmission and epidemiology. In this research, experiments were conducted to characterize the transmission of MaYMV in terms of persistence and efficiency of transmission by *R. maidis*, as well as to investigate the possibility of transmission by other aphids, and the infection of two other species of cultivated grasses, oats (*Avena sativa* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench). The results showed that MaYMV can be transmitted in maize by other aphids of different genera, such as *R. padi* (L.), *Schizaphis graminum* (Rondani) and *Melanaphis sorghi* (Theobald). The transmission efficiency of MaYMV is low, with a probability of transmission per individual estimated at around 1% per day of inoculation access period. The aphid *R. maidis* retains MaYM in its body, as well as the ability to transmit the virus for at least 5 days, without a drop in transmission efficiency, which is expected for a persistent circulative mode of transmission. MaYMV can be transmitted by *R. maidis* from maize source plants with mixed infections of SCMV, maize rayado fino virus (MRFV), and maize striate mosaic virus (MSMV). Transmission of MaYMV to maize is not influenced by prior SCMV infection in the recipient plant. The MaYMV isolate used in the present study infected corn and oats, but not sorghum; interestingly, it did not show apparent symptoms in any of the hosts and corn genotypes evaluated. The information generated by this work deepens the knowledge about the relationships of MaYMV with aphid vectors, host plants and other viruses, particularly SCMV.

Keywords: Corn leaf aphid, Maize diseases, Vector-pathogen relationships

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gaiolas de acrílico elaboradas nesse trabalho para uso em ensaios de transmissão e persistência. Os afídeos foram confinados sobre folhas de milho. A gaiola de acrílico apresenta uma base isopor, as quais são coladas com auxílio de fita adesiva. Para evitar a quebra da folha, a gaiola foi sustentada com palito de madeira. 28
- Figura 2.** Metodologia de inoculação mecânica de SCMV em plantas-teste de milho. A – Escolha de planta-fonte sintomática e com confirmação por RT-PCR convencional de infecção por SCMV. B – Aplicação de carbureto de silício para ferimento da folha da planta-teste. C – Aplicação de suspensão obtida com maceração de folha sintomática de planta-fonte de SCMV em solução tampão (água destilada + KH_2PO_4). 30
- Figura 3.** Metodologia de extração de RNA de plantas e afídeos. A – Coleta de folhas de plantas sintomáticas. B – Armazenamento das folhas em papel alumínio e gelo, para evitar a degradação do RNA. C e D – maceração do material em nitrogênio líquido. E – Adição de trizol para rompimento das células. F – Etapa de agitação para exposição de todas as células aos reagentes de extração de material genético. G – Centrifuga para separação do material vegetal dispensável (parede celular, fibras, etc.) e RNA. H – Coleta do RNA..... 33
- Figura 4a.** Altura média de plantas no estágio fenológico V6 (Magalhães e Durães, 2006) de diferentes genótipos de milho, que testaram positivamente ou negativamente para maize yellow mosaic vírus (MaYMV) por RT-PCR. As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média. Não houve diferença estatística entre plantas positivas e negativas para os genótipos avaliados, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 45
- Figura 4b.** Altura média de plantas no estágio de pendoamento (VT) de diferentes genótipos de milho, que testaram positivamente ou negativamente para maize yellow mosaic vírus (MaYMV) por RT-PCR. As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média. As médias de plantas positivas e negativas de um mesmo genótipo com a mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Taxas de transmissão por *Rhopalosiphum maidis* em períodos sucessivos (24 h) de acesso à inoculação (PAI) após a aquisição por 2 dias em planta de milho com infecção mista por sugarcane mosaic virus e maize yellow mosaic virus 37
- Tabela 2.** Taxas de transmissão por *Rhopalosiphum maidis* em períodos sucessivos (24h) de acesso à inoculação (PAI), após a aquisição por 2 dias em planta de milho com infecção simples por maize yellow mosaic virus 38
- Tabela 3.** Taxas de transmissão de maize yellow mosaic vírus (MaYMV) por *Rhopalosiphum maidis* para plantas-teste de milho com ou sem inoculação mecânica prévia de sugarcane mosaic vírus (SCMV), em períodos sucessivos de acesso à inoculação (PAI) após a aquisição por dois dias em planta de milho com infecção simples por MaYMV. Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste nos períodos de inoculação 40
- Tabela 4.** Taxas de transmissão por *Rhopalosiphum maidis* em períodos sucessivos de acesso à inoculação (PAIs) em plantas-teste de milho, após um período de aquisição (PAA) de 2 dias em planta-fonte com infecção mista por maize yellow mosaic vírus (MaYMV) e sugarcane mosaic vírus (SCMV), seguido ou não de limpeza viral. Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste nos períodos de inoculação 42
- Tabela 5.** Taxas de transmissão de maize yellow mosaic vírus (MaYMV) por *Rhopalosiphum maidis* para diferentes genótipos de milho durante um período de acesso à inoculação de 4 dias (20 afídeos/planta-teste), após um período de acesso à aquisição de 2 dias em planta-fonte infectada com sugarcane mosaic vírus (SCMV), seguido de uma limpeza de 4 horas em folha sadia de milho..... 44
- Tabela 6.** Resultados da análise estatística para comparação de altura média nos estádios fenológicos V6 e pendoamento (VT), entre plantas do mesmo genótipo que testaram positivamente e negativamente por PCR..... 46
- Tabela 7.** Taxas de transmissão de maize yellow mosaic vírus (MaYMV) por *Rhopalosiphum maidis* para plantas-teste de milho, aveia e sorgo durante um período de acesso à inoculação de 4 dias, após um período de acesso à aquisição de 2 dias em planta-fonte com infecção simples por MaYMV 47
- Tabela 8.** Taxas de transmissão por diferentes espécies de afídeos durante período de acesso à inoculação de 5 dias em plantas-teste milho, e após um período de acesso à aquisição de 2 dias (PAA) em planta-fonte com infecção mista por maize yellow mosaic vírus (MaYMV) e sugarcane mosaic vírus (SCMV)..... 48
- Tabela 9.** Taxas de transmissão por *Rhopalosiphum maidis* após um período de aquisição (PAA) de 2 dias em plantas de milho no campo com infecções mistas com outros vírus e/ou mollicutes. Após o PAA, os afídeos foram submetidos a um PAI de 4 dias, com 20 afídeos por planta-teste..... 50

1. INTRODUÇÃO

Em relação à safra de 21/22 o Brasil passou por um aumento de 5% na área de produção de grãos, alcançando mais de 78 milhões de hectares. Além disso, a produtividade média elevou mais de 11% (Conab, 2023). E, de acordo com a mesma Instituição, para a safra de 22/23 prevê-se um aumento de 16,5%. Segundo o USDA (2020) e levantamento de Shahbandeh (2023), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays*, L.), estando atrás apenas dos Estados Unidos e China, respectivamente. Além da produtividade, as áreas destinadas a esta cultura vêm aumentando. Os estados do Paraná e Mato Grosso se destacam devido à área dedicada ao milho de segunda safra, conhecida popularmente como “safrinha”. Além dos citados, Mato Grosso do Sul também é somado nos destaques para produção somada das três safras nos últimos anos (Conab, 2023). Os demais estados brasileiros também apresentam participação na produção deste grão, tendo em sua maioria, mais de uma safra de milho ao ano (Conab, 2023), o que permite a permanência da cultura do milho por mais tempo no campo, formando uma “ponte verde” para a sobrevivência de pragas ao longo do ano.

Este cenário é agravado pela ocorrência de plantas voluntárias de milho (tiguera) em plantios subsequentes de outras culturas e por condições climáticas favoráveis a pragas, gerando-se uma série de problemas fitossanitários. Um exemplo é a estiagem que afetou o oeste do estado de São Paulo e promoveu o aumento na incidência de lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Brunini et al., 2022). Além dos insetos pragas, conhecidos pelos seus danos diretos, como é o caso dos lepidópteros e coleópteros, ainda existe grande preocupação com os insetos que são vetores de fitopatógenos, tais como afídeos e cigarrinhas (hemípteros).

Os impactos de insetos vetores sobre as lavouras é muito importante, pois são responsáveis pela transmissão de 75% dos vírus de plantas (Ghosh et al., 2019). Dentre os insetos vetores na cultura do milho, destaca-se a cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), responsável pela transmissão de quatro patógenos: o espiroplasma do milho (“corn stunt spiroplasma”, CSS) e o fitoplasma do milho (“maize bushy stunt phytoplasma”, MBSP), associados aos enfezamentos pálido e vermelho, respectivamente, além do vírus da risca (maize rayado fino virus, MRFV) (Cota et al., 2018) e do vírus do mosaico estriado do milho, o maize striate mosaic virus (MSMV) (Vilanova, 2022). Tratando-se de enfezamentos, as perdas na produção podem chegar a 100%, variando

conforme a época de infecção e o nível de suscetibilidade da cultivar utilizada (Cota, et al. 2018).

Embora existam diversos estudos envolvendo *D. maidis* e os fitopatógenos por ela transmitidos em milho, são poucos os trabalhos que se dedicam a estudar outro inseto vetor também importante, o pulgão-do-milho, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), responsável pela transmissão do sugarcane mosaic virus (SCMV) e do maize yellow mosaic virus (MaYMV). Apesar de pouco estudada, a infecção por esses vírus apresenta impacto no desenvolvimento de seus hospedeiros, provocando redução de porte de planta, folhas com sintomas de mosaico ou ainda manchas avermelhadas (Stewart et al., 2021).

O MaYMV foi identificado pela primeira vez na China (Chen et al., 2016). Em seguida, o mesmo vírus foi registrado no Equador (Bernreiter et al., 2017), no continente Africano (Palanga et al., 2017; Yahaya et al., 2017) e no Brasil (Gonçalves et al., 2017). Todos os registros ocorreram em um curto período e em diferentes continentes, indicando um alto nível de disseminação do vírus e um potencial risco para as lavouras de todo o mundo. Na China, Brasil, Equador e África (Burquina e Etiópia), os registros se deram em cultura de milho, porém na Nigéria (África) o vírus foi encontrado na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) e na gramínea *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.), conhecida popularmente por capim-camalote.

Desde o seu primeiro registro, atribui-se o MaYMV à família *Solemoviridae*, gênero *Polerovirus*, com base em sequenciamento genético e presença de proteínas compatíveis (Chen et al., 2016). O genoma desse vírus apresenta 5642 nucleotídeos, dos quais aproximadamente 70% coincidem com o maize yellow dwarf virus (MYDV) (Chen et al., 2016), também classificado no gênero *Polerovirus*. Devido à semelhança, alguns trabalhos foram publicados indicando o MaYMV como *Maize yellow dwarf virus* RMV2 e MYDV-like (Mlotshwa et al., 2021). Entretanto, todos eles se referem à mesma espécie: MaYMV (Wang et al., 2016).

A família *Solemoviridae* é composta por quatro gêneros: *Polerovirus*, *Enamovirus*, *Polemavirus* e *Sobemovirus*, tendo como vetores afídeos, besouros e cigarrinhas (ICTV, 2023a). Entretanto, Ghosh et al. (2019) relatou que um vírus do gênero *Polerovirus*, pepper whitefly-borne vein yellow virus, é transmitido pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn), e não por afídeos. Somente o gênero *Polerovirus* compreende, ao menos, 31 espécies de vírus, todas apresentando transmissão do tipo persistente circulativa (não propagativa) (Mlotshwa et al., 2021). Os polerovirus são vírus de plantas constituídos de RNA restritos às células do floema e os sintomas típicos resultantes da infecção envolvem o amarelecimento foliar, sendo

esse o sintoma mais comum, associado ou não a nanismo de plantas (Ghosh et al., 2019; Costa et al., 2020).

Gonçalves et al. (2020) demonstraram a transmissão do MaYMV por *R. maidis* em milho, utilizando um período de acesso à aquisição (PAA) de 2 dias e um período de inoculação (PAI) de 5 dias, e 30 insetos por planta-teste durante o PAI. Stewart et al. (2020) e Stewart et al. (2021) adotaram 7 dias de PAA e 3 dias de PAI, adicionando cinco afídeos, do gênero *Rhopalosiphum*, por planta-teste para a transmissão de MaYMV. Mlotshwa et al. (2021) também obtiveram sucesso na transmissão desse vírus utilizando a mesma metodologia que Stewart et al. (2020) e avaliaram a metodologia de inoculação via VPI (“vascular puncture inoculation”), um tipo de inoculação mecânica, obtendo eficiência de transmissão de 16%. Embora as evidências desses estudos indiquem uma transmissão do tipo persistente circulativa, ainda são necessários mais estudos para uma melhor caracterização da transmissão do MaYMV por afídeos e avaliar a existência de outras espécies vetoras.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar a transmissão do MaYMV quanto à persistência e eficiência de transmissão por *R. maidis*, além de investigar a sua possibilidade de transmissão por outros afídeos, e de infecção de outras duas espécies de gramíneas, a aveia (*Avena sativa* L.) e o sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do milho

O milho (*Zea mays*, L.) é uma das culturas mais importantes na agricultura nacional, ocupando a segunda posição em termos de volume produzido de grãos (Agência Brasil, 2023). O cereal tem origem nas Américas, entre o sudoeste dos Estados Unidos e América Central, mas hoje é consumido em todas as regiões do mundo (Pereira, 2014). Na safra de 2022/2023 prevê-se 153,5 milhões de toneladas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill.) e 125,8 milhões de toneladas de milho (Conab, 2022). Além da importância nacional, a participação global também é significativa ficando como o segundo grão e primeiro cereal mais exportado, sendo que os principais países importadores deste produto são Egito, Irã, Espanha e Japão (ANEC, 2021). Atualmente, o Brasil só perde em produção e área plantada para outros dois países, Estados Unidos e China (Abimilho, 2022).

A partir do grão do milho vários produtos são obtidos, como óleo refinado, farelos, farinhas e fubás, amidos industriais e alimentícios, espessantes, colantes, xaropes, glicose, dextrose, corantes, fibras, como matéria-prima para elaboração de pratos típicos, conservas, etc. (Uru, 2007; Duarte 2021). Apesar da abundância e variedade de usos na indústria alimentícia, química e farmacêutica, grande parte do seu uso também se dá para produção de ração animal (Crop Life Brasil, 2020) – em forma de silagem, grãos inteiros, grãos desintegrados. Em suma, existem em torno de 3.500 formas de uso desta espécie (Contini et al., 2019). Do consumo nacional total no ano de 2022, 37% foi direcionado para consumo industrial; 44% voltado para uso como combustível (etanol) e apenas 0,2% voltado para o consumo in natura (Abimilho, 2022).

Diante da tamanha demanda por esse grão, hoje já se torna comum três safras ao ano, sendo a primeira safra plantada entre os meses de setembro a dezembro; a segunda safra de janeiro a setembro (dependendo da região); e a terceira safra ocorrendo o plantio entre maio e junho principalmente nas regiões norte e nordeste do país (Sergipe, Alagoas, Bahia, Pernambuco e Roraima) (Crop Life Brasil, 2020). A princípio, a primeira safra compreendia a época de maior produção do grão, porém em 2011 houve a primeira inversão de produção, sendo que a segunda safra (ou safrinha) passou a se destacar quanto a produção e desde então se destaca todos os anos (Contini et al., 2019).

O milho se apresenta como uma cultura sucessora à soja, em cultivo consorciado com gramíneas forrageiras, na rotação de culturas prevista em plantio direto ou em cultivos

sucessivos de milho; esta cultura se destaca principalmente nos estados do Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais (BNB, 2021). A maioria dos grandes produtores nacionais compreende regiões de clima quente e úmido o que acelera o ciclo da maior parte de pragas e doenças presentes a campo (Coêlho, 2021). Na cultura do milho, quase 10% do custo de produção engloba investimento em fungicidas, inseticidas e herbicidas (por ordem de importância) (Crop Life Brasil, 2019); além das aplicações de defensivos agrícolas, outra estratégia adotada é o uso de híbridos resistentes a essas pragas e doenças. Do total de materiais transgênicos aprovados, 70% destes são voltados para resistência ou tolerância a insetos (Crop Life Brasil, 2020).

Apesar dos esforços, muitas são as doenças e pragas que podem afetar as áreas de milho. Mancha-branca (*Pantoea ananatis*), ferrugens (*Puccinia polysora*, *P. sorghi* e *Physopella zea*), cercosporiose (*Cercospora zea-maydis*), podridões de espigas (*Fusarium* spp., *Stenocarpella maydis*), enfezamentos (fitoplasma e espiroplasma) e viroses; como pragas a cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*, DeLong & Wolcott) vêm recebendo destaque nos últimos anos; além de lagartas, percevejos e pulgões que são favorecidos com as condições edafoclimáticas brasileiras (Casela, Ferreira, Pinto, 2006; Américo et al., 2016; Aegro, 2023). Muitas das pragas e doenças se alojam e usam de hospedeiros alternativos as culturas que entram no sistema agrícola ou ainda as plantas daninhas ou tigueras que são esquecidas no campo (Sabato, 2018). Diante dos cenários de cultivo e épocas de semeadura, algumas doenças se destacam e os problemas de queda de produtividade se intensificam (Cunha et al., 2019).

2.2 Viroses

As viroses são de grande importância agrícola, pois não há técnica ou ferramenta economicamente viável para curar uma planta infectada a campo, diferente de doenças causadas por fungos ou bactérias (Fajardo e Nickel, 2019). 70% dos vírus vegetais são transmitidos por vetores, e 90% dos vetores são insetos (Ghosh et al., 2019). No caso dos insetos, para que a transmissão ocorra, é necessária a aquisição por meio da alimentação, ou picada de prova, em planta infectada por vírus (Torrez Filho, 2002); em seguida, devem ser capazes de reter esse patógeno em alguma estrutura de seu corpo ou em seu organismo (Parra et al., 2010; Fajardo e Nickel, 2019; Ávila et al., 2021), variando-se o modo e especificidade da interação e, por fim, devem ser capazes de inocular uma planta sadia com o vírus (Oliveira et al., 2019). Durante esse processo, os insetos precisam, então, escolher uma planta infectada

como uma boa hospedeira para si (Komada, 2019). Diante da complexidade das relações, não se trata de um simples carreamento ou transporte do microrganismo.

Nas plantas, esses vírus habitam as células vivas (floema, xilema, epiderme, parênquima), o que está estritamente relacionado com o comportamento alimentar do inseto vetor envolvido no patossistema (Salas, 2010; Lima, 2013).

2.2.1 Viroses no milho

Dentre as doenças presentes na cultura do milho, as viroses também são responsáveis por impactos na produtividade. Os sintomas de viroses são variados e sua agressividade aumenta conforme a suscetibilidade do genótipo do milho e o isolado de vírus estudado (Gonçalves et al., 2011). O MRFV (maize rayado fino virus) e o SCMV (sugarcane mosaic virus) correspondiam a um grupo muito frequente e conhecidos como os principais vírus encontrados no Brasil na cultura do milho (Gonçalves et al., 2007). O MRFV é transmitido pela cigarrinha-do-milho, causa pontuações cloróticas, manchas ou linhas curtas formando riscas quando a doença está avançada, distribuídas na parte superior das folhas jovens (de Souza et al., 2016; Campo em Foco, 2020; Coutinho, 2020; Gonçalves et al., 2020; Ribeiro e Canale, 2021). Já o SCMV é transmitido pelo pulgão *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), causa áreas cloróticas entremeadas com áreas verdes nas folhas (lembrando um mosaico) (Ferreira et al., 2007; Embrapa, 2013). Como resultado da infecção do SCMV, os colmos podem apresentar encurtamento de internódios (Gonçalves, 2016), sintoma conhecido como nanismo, e as espigas apresentam deficiência, ficando atrofiadas ou mal granadas (Ferreira et al., 2007). Sintomas mais graves de tombamento também têm sido observados, mesmo não havendo qualquer podridão na raiz ou início do colmo da planta (Maliszewski, 2021).

Apesar do SCMV ter sido o único vírus causador de mosaico em milho descoberto no Brasil, no mundo outros vírus podem ser responsáveis por esse tipo de sintoma, como o maize dwarf mosaic virus (MDMV), johnsongrass mosaic virus (JGMV), sorghum mosaic virus (SrMV) e o zea mosaic virus (ZeMV) (Gonçalves et al., 2007a; Wu et al., 2013; Zhang et al., 2016; Souza et al., 2017; Cabi, 2021).

Atualmente, além da frequente presença de SCMV e MRFV, outros vírus vêm tomando espaço no cenário agrícola brasileiro, o MaYMV (maize yellow mosaic virus) (Gonçalves et al., 2020) e o maize striate mosaic virus (MSMV) (Fontenele et al., 2018);

sendo o primeiro transmitido por afídeos (Gonçalves et al., 2020; Stewart et al., 2020; Stewart et al., 2021) e o último pela cigarrinha-do-milho (Vilanova et al., 2022).

Segundo a plataforma de busca *Google Scholar* (2023) são mais de 100 publicações abordando o MRFBV e mais de 1000 abordando o SCMV, enquanto que o MaYMV conta com pouco menos de 50. Isso se dá pela recente descoberta do último patógeno e muitas vezes esse vírus era considerado como parte do complexo de mosaico do milho, não sendo possível separar a campo as espécies envolvidas. Porém, Gonçalves et al. (2007) já contextualizavam um possível cenário de maior impacto do mosaico na cultura, visto que a disseminação do vírus e as pontes verdes (plantio de gramíneas sucessivamente e presença de plantas daninhas) ao longo de todo ano poderia gerar novas estirpes com maior agressividade, além do agravante da infecção mista por diferentes espécies de vírus.

2.2.1.1 Potyvirus

Os vírus do gênero *Potyvirus* pertencem a família *Potyviridae* (Wu et al., 2013). O sintoma causado por membros dessa família compreende mosaicos foliares e os principais vetores são afídeos, ácaros e fungos (Gibbs e Mackenzie 1997); sendo que os afídeos são os vetores majoritários para o gênero *Potyvirus*, os ácaros são vetores dos membros do *Rymovirus* e os fungos transmitem os vírus do gênero *Bymovirus*. No gênero *Potyvirus*, a espécie SCMV se destaca para a cultura do milho e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.), sendo transmitido por várias espécies de afídeos, apresentando maior eficiência para *R. maidis* e *Schizaphis graminum* (Rondani) (Gonçalves et al., 2011). Os potyvirus apresentam transmissão não persistente e alto índice de eficiência com transmissões mecânicas, com isso, as espécies desse gênero não circulam nem se propagam no organismo de seus vetores, são retidos apenas no estilete dos insetos que transmitem as partículas virais até que todas sejam liberadas.

Os potyvirus (Wu et al., 2013), apresentam meia-vida de minutos e o tempo se deve muito ao comportamento alimentar do inseto no momento (Rocha et al., 2011). Esses vírus não circulam no inseto e permanecem no estilete, apresentam uma maior gama de insetos vetores quando comparados a espécies de patógenos de outros gêneros que apresentam transmissão do tipo semi-persistente, persistente circulativa ou propagativa (Gray e Gildow, 2003). Com a alimentação do inseto em plantas saudáveis, o vírus é liberado do estilete. Além de facilmente liberados, são facilmente adquiridos, visto que picadas de prova já são suficientes para o alcance das partículas virais que estão presentes nas células superficiais das plantas. O

PAA (período de acesso à aquisição) e o PAI (período de acesso à inoculação) que ocorrem durante a alimentação do inseto na planta, levam cerca de segundos a minutos (Rocha et al., 2011). Para que o inseto seja capaz de adquirir ou inocular o vírus tão rapidamente, esse microrganismo fica alocado em células mais superficiais da planta, as células epidérmicas. Além do gênero *Potyvirus*, outros gêneros têm esse tipo de transmissão, como o *Carlavirus*, *Fabavirus* e *Cucumovirus*. Os afídeos são os insetos que mais apresentam o comportamento de picada de prova em plantas e, por isso, são o grupo de insetos que mais transmitem esse tipo de vírus (Fajardo e Nickel, 2019).

2.2.1.2 Polerovirus

A família *Solemoviridae* abrange quatro gêneros: *Polerovirus*, *Enamovirus*, *Polemovirus* e *Sobemovirus*, tendo como vetores afídeos, besouros, cigarrinhas e percevejos, além de ser possível e eficiente a transmissão mecânica (ICTV, 2023a). Os polerovirus apresentam 26 espécies conhecidas atualmente e são compostos por uma fita simples de RNA, são transmitidos por afídeos de forma circulativa, sendo restritos no floema da planta (Garcia-Ruiz et al., 2021; ICTV, 2023b). Os sintomas desse gênero incluem formação de estrias nas folhas, amarelecimento, enrolamento e espessamento das folhas e atrofiamento das plantas (ICTV, 2023b). O PAA e o PAI do polerovirus variam de minutos a horas a partir do alcance do floema e podem circular no inseto vetor por alguns dias (Gray e Gildow, 2003), até que o vírus seja totalmente liberado, já que nesse tipo de transmissão não há multiplicação no inseto (Rocha et al., 2011). O gênero *Potyvirus* não tem período de latência, porém para o gênero *Polerovirus* pode haver latência de algumas horas, sendo que esse termo está atrelado ao tempo de incubação do vírus no inseto e disponibilidade para ser inoculado em novas plantas (Gray e Gildow, 2003).

O MaYMV, membro do gênero *Polerovirus*, foi reportado no mundo pela primeira vez em 2016, na China, (Chen et al., 2016) e, posteriormente, apareceu em alguns países da África (Yahaia et al., 2017; Palanga et al., 2017), Brasil (Gonçalves et al., 2020) e Equador (Bernreiter et al., 2017). Em países europeus e no norte da América ainda não foi notificada essa virose. Apesar da recente descoberta, entre os anos de 2021 e 2022, segundo estudos de Oliveira et al. (2022), em amostras de campo quase 40% das plantas de milho apresentavam o MaYMV, sendo que as infecções se encontram no formato misto, com dois, três ou até quatro

vírus simultaneamente na mesma planta. Diante da recente descoberta, poucos trabalhos abordaram a sintomatologia, possíveis vetores e a epidemiologia do MaYMV.

De acordo com Gonçalves et al. (2020), não foi possível transmitir MaYMV via inoculação mecânica, confirmando que o vírus deve ser restrito ao floema da planta. Os autores também estudaram a sinergia entre MaYMV e SCMV, já que ambos compartilham o vetor em comum, *R. maidis* (Gonçalves et al. 2020). Através de seu estudo, foi possível alcançar 100% de transmissão de MaYMV independente da planta-teste estar previamente infectada com SCMV. Apesar de não interferir na taxa de transmissão, os sintomas se tornaram mais agressivos na infecção mista. Gonçalves et al. (2020) relatam sintomas de clorose semelhantes ao mosaico comum do milho, porém Stewart et al. (2021), apontam sintomas foliares avermelhados nas bordas das folhas, além da geração de plantas com nanismo.

Um estudo chinês apontou a distribuição de MaYMV pelo país, onde foi possível observar a variação da predominância do vírus nos diferentes locais, sendo que em um deles mais de 50% das amostras apresentavam a virose, enquanto em outras regiões apenas 2,5% tinham incidência de MaYMV (Sun et al., 2021). O estudo também indicou baixo fluxo gênico e uma significativa diferenciação genética do MaYMV nas três regiões chinesas estudadas (Sun et al., 2021).

2.3 Afídeos vetores dos vírus para a espécie do milho

Dentre as mais de 90 espécies de insetos herbívoros que apresentam potencial de ataque em plantas de milho (Laranjeiras, 2016), os afídeos representam um grupo de grande importância para o manejo (Pozebon, 2022). No início do desenvolvimento, a cultura sofre com populações de percevejos e infestações de cigarrinhas do milho e, ao chegar no final do ciclo, os pulgões passam a ter maior importância (Pitta e Mendes, 2021). Os afídeos pertencem à ordem Hemiptera, subordem Sternorrhyncha. As espécies de importância agrícola fazem parte da família Aphididae, subfamília Aphidinae e tribos Aphidini e Macrosiphini (Gallo et al., 2002). Esses insetos causam dois tipos de danos nas culturas agrícolas. A própria sucção da seiva pelos seus estiletes gera um dano direto, danificando as células do tecido vegetal e injetando toxinas no local de alimentação. E os danos indiretos consistem na transmissão de vírus (Pitta e Mendes, 2021) e no acúmulo de *honeydew*, o qual interfere principalmente a fase de polinização, uma vez que a substância açucarada retém o pólen, reduzindo em até 90% a produção final dos grãos (Chen et al., 2019). Além disso, os

afídeos apresentam alta tolerância a uma classe de metabólitos produzida pelo milho como forma de defesa a fitófagos, os benzoxazinoides. (Chen et al., 2019).

Dentre os afídeos mais comuns (*R. padi*, *S. graminum*, *Sitobion avenae* (Fabricius) e *Metopolophium dirhodum* (Walker)), *R. maidis* é o mais recorrente, principalmente em regiões mais quentes do planeta (Chen et al., 2019).

O afídeo *S. graminum* infesta plantas jovens e adultas, estando presente nas bainhas e folhas baixas, causando bronzeamento e até a morte do tecido foliar (Ribeiro e Waquil, 2006). Já *R. maidis* tem preferência por tecidos mais novos da planta, como o cartucho, panícula e gemas florais (Domingues, 2022). Afídeos do gênero *Melanaphis* são capazes de reduzir até 50% da produção de sorgo (Domingues, 2022).

O *R. padi* transmite alguns potyvirus, como o SCMV, sorghum mosaic virus (SrMV), maize dwarf mosaic virus (MDMV), johnsongrass mosaic virus (JGMV), zea mosaic virus (ZeMV) e pennisetum mosaic virus (PenMV); e alguns polerovirus como sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) e MaYMV (Stewart et al., 2020)

Além de transmitido por *R. maidis* e *R. padi*, o SCMV também é transmitido pelo pulgão *S. graminum* (Stewart et al., 2020). Esse afídeo também transmite o BYDV (barley yellow dwarf virus) que faz parte da mesma família que o polerovirus MaYMV, a *Solemoviridae* (Parizoto et al., 2013). Nessa família alguns pulgões são vetores recorrentes: *R. maidis*, *R. padi*, *S. avenae* e *S. graminum* (Lau et al., 2022). Apesar de várias espécies de afídeos serem potenciais insetos vetores, o *R. maidis* se sobressai em porcentagem de eficiência, apresentando taxas próximas de 90%, enquanto o *R. padi* apresenta taxas abaixo de 50% (Stewart et al., 2020)

A coevolução entre inseto vetor e vírus fitopatogênico permite, em alguns casos, um aumento na ocorrência e sucesso do patossistema. Klein e Smith (2020) mostram em seus estudos que plantas de sorgo infectadas com MDMV, SCMV ou SRMV atraem mais indivíduos de *R. maidis* quando comparadas às plantas saudáveis, o que ocorre por meio de alterações visuais das plantas ou até mesmo por alterações na liberação de compostos metabólicos.

2.4 Estratégias de manejo no patossistema afídeo-milho-vírus

O manejo do patossistema envolvendo os afídeos como insetos vetores é um desafio, visto que esses insetos surgem nas épocas finais de desenvolvimento vegetativo e início de

ciclo reprodutivo (Pitta e Mendes, 2021), quando as culturas já estão desenvolvidas e com as linhas fechadas, impedindo a entrada de máquinas a campo sem danificar as plantas. Além disso, no início da colonização os insetos se alojam no cartucho da planta, dificultando o acesso de produtos químicos ou biológicos (Pereira et al., 2006).

Diante da dificuldade na aplicação dos químicos e dos seus impactos na natureza e ao homem, o melhoramento genético também constitui uma ferramenta para o controle dos afídeos (Boer, 2017). Estudos indicam o melhoramento de espécies de plantas como feijão (*Phaseolus vulgaris*, Lineu) e sorgo a fim de evitar a instalação e multiplicação dos insetos na cultura. Genótipos de feijão apresentaram maior resistência ao ataque de pulgões provavelmente seguindo a via da antibiose (liberação de algum composto que promove maior mortalidade dos afídeos) (Silva e Bleicher, 2010; Ferreira et al., 2020). Como na maioria dos casos, no Brasil, os afídeos se multiplicam por partenogênese vivípara, mesmo os casos em que adultos aparentemente não foram atingidos, sua prole acabou sendo afetada, já que se desenvolve no interior do adulto. O melhoramento genético é uma via que torna possível a tolerância à presença do inseto vetor e também ao fitopatógeno que esse inseto transmite (da Silva, 2014; Boer, 2017).

Outra estratégia de manejo se dá pelo uso do controle biológico, seja por predadores, como joaninhas (Coccinellidae) e tesourinhas (Forficulidae), ou por parasitoides, como as vespas das famílias Aphelinidae e Braconidae. As vespas não são específicas e conseguem atingir diferentes gêneros de afídeos, alcançando muitas espécies de importância agrícola (Silva et al., 2018; Cruz, 2015).

O gênero *Aphidius* apresenta uma quantidade vasta de vespas pequenas parasitoides de pulgões. Seus ovos são inseridos, individualmente, em ninfas de pulgões e esses se desenvolvem consumindo, nos primeiros ínstares, as células especializadas do afídeo, chamadas de teratócitos, e posteriormente avança para as demais células até que sobre apenas a cutícula do hospedeiro, que passa a apresentar um aspecto seco mumificado (Costa, 2010). Após a transformação em pupa, as vespas emergem por meio de um orifício criado no corpo mumificado do afídeo. Uma única fêmea desse gênero é capaz de colocar cerca de trezentos ovos durante um período de vida que dura de quatro a cinco dias (Cruz, 2022). Além das espécies exóticas que foram introduzidas no país para o controle de afídeos, há estudos acerca de espécies nativas que podem ser promissoras no controle biológico (Sary et al., 2007). O presente estudo, apesar de não abordar medidas de controle para o MaYMV, traz relevância no conhecimento da doença causada pelo vírus para então chegar a um manejo adequado no campo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos (LIV), Departamento de Entomologia e Acarologia (LEA), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

3.1. Obtenção de plantas sadias

Plantas de milho (*Zea mays*, L.) sadias do híbrido LP20 (fornecido pela empresa LongPing High-Tech Sementes & Biotecnologia LTDA), foram obtidas em vasos de 10-12 cm de diâmetro com substrato comercial (Tropstrato HT, Vida Verde Ltda, Mogi-Mirim, SP), em casa-de-vegetação livre de insetos vetores, com tela antiafídica nas laterais, cobertura de filme plástico de PVC e entrada com antecâmara.

As plantas de LP20 foram utilizadas na criação de insetos sadios e, para os experimentos de transmissão de vírus, utilizou-se o híbrido LP2021 (adquirido na mesma empresa), o qual, nos ensaios realizados nesta pesquisa, apresentou maior susceptibilidade ao MaYMV. Nos experimentos de transmissão foram usadas plantas sadias no estágio de duas folhas expandidas (V2) e para criação dos insetos, plantas em fase de pré pendoamento.

3.2. Obtenção de afídeos vetores

3.2.1 *Rhopalosiphum maidis* (Fitch)

Os afídeos usados nos experimentos foram coletados em plantios de milho na Esalq/USP, em Piracicaba-SP, identificados morfológicamente, e passaram imediatamente por limpeza de vírus, realizada em placas de Petri contendo folhas sadias de milho. As ninfas geradas pelas fêmeas coletadas no campo foram resgatadas em intervalos de no máximo uma hora e transferidas para plantas sadias de milho, originando colônias livres de vírus, as quais foram mantidas em casa de vegetação equipada com sistema de arrefecimento tipo pad-fan e aquecedor ativado por termostato para controle de temperatura ($25 \pm 5^\circ\text{C}$). A colônia do pulgão-do-milho, *R. maidis*, foi alocada no interior de gaiolas (0,8 x 0,5 x 1,0 m) com armação de ferro, cobertas com tecido voile.

3.2.2 *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) e *Schizaphis graminum* (Rondani)

Os afídeos das espécies *R. padi* e *S. graminum* foram fornecidos pela Embrapa Trigo, sendo transportados de Passo Fundo (RS) para Piracicaba em plantas de aveia (*Avena sativa*, L.) em abril de 2022, provenientes de colônias sadias mantidas naquela instituição. As colônias das duas espécies foram mantidas, separadamente, em plantas de aveia no interior de gaiolas com armação de ferro (0,8 x 0,5 x 1,0 m), cobertas com tecido voile, em casa-de-vegetação climatizada, nas condições ambientais descritas anteriormente, com substituição das plantas duas vezes por semana.

3.2.3 *Melanaphis sorghi* (Theobald)

Afídeos da espécie *M. sorghi* também foram coletados em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) no campo experimental da Esalq/USP, Piracicaba-SP, em meados de janeiro de 2021, ocasião em que se observou altas taxas de infestação desse inseto na cultura. Os insetos foram levados para laboratório, onde passaram imediatamente por limpeza viral, seguindo a mesma metodologia aplicada para a espécie *R. maidis*. As ninfas geradas a partir dos insetos coletados no campo foram transferidas para plantas sadias de sorgo, sendo a colônia resultante mantida em gaiolas com armação de ferro (0,8 x 0,5 x 1,0 m) cobertas com tecido voile, nas condições de casa de vegetação descritas anteriormente, efetuando-se a substituição de plantas de sorgo sadias semanalmente.

Devido à semelhança com a espécie *M. sachari* e a recente introdução do *M. sorghi* no Brasil (Lau et al., 2023; Sampaio et al., 2022), os insetos foram enviados à Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) para identificação morfológica pela especialista doutora Regina Celia Zonta de Carvalho, confirmando-se a espécie *M. sorghi*.

3.3. Obtenção do isolado viral e procedimentos gerais de transmissão

Para obtenção e perpetuação do isolado viral e execução dos experimentos de transmissão, foram usados seedlings sadios do híbrido suscetível LP21 com 2 folhas expandidas (estádio V2). O isolado de MaYMV foi obtido a partir de plantas de milho sintomáticas marcadas no campo experimental da Esalq/USP, em Piracicaba-SP, submetidas à

extração de RNA com Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA), seguindo as recomendações do fabricante e em seguida foram submetidas à técnica da reação em cadeia da polimerase RT-PCR convencional. Com a transcriptase reversa, obteve-se o cDNA (AMV Reverse Transcriptase - Promega). As amostras de cDNA obtidas foram submetidas a PCR convencional com primers específicos para MaYMV (MaYMVP2F/MaYMVP2R) seguindo a descrição de Gonçalves et al. (2020).

Dessas plantas positivas para MaYMV por RT-PCR, foram destacadas folhas sintomáticas para a aquisição do vírus por *R. maidis*. Para isso, aproximadamente 200 afídeos foram confinados sobre as folhas destacadas em placas de petri com ágar-água, por um período de acesso à aquisição (PAA) de 2 dias. Este período é suficiente para os afídeos alcançarem o floema vascular e ingerirem quantidade suficiente de polerovirus, que são restritos a esse tecido vascular (Gray e Gildow, 2003). Em seguida, os insetos foram transferidos para folhas de milho sadias por aproximadamente 4 horas, a fim de limpar os estiletes dos insetos e impedir a transmissão subsequente de um possível vírus não persistente, o sugarcane mosaic virus (SCMV), conforme descrito por Stewart et al. (2020). Após a limpeza, os insetos foram transferidos em grupos de 20 indivíduos para um período de acesso à inoculação (PAI) de 5 dias em seedlings sadios de milho no estágio V2, no interior de gaiolas de voile. Os PAAs e PAIs foram conduzidos em sala climatizada (25 ± 2 °C e fotofase de 14h).

Para a perpetuação dos isolados virais, foram realizadas transmissões sequenciais a cada 30 dias, a partir de plantas de milho inoculadas que se mostraram positivas por RT-PCR para MaYMV, utilizando-se os mesmos PAAs e PAIs descritos anteriormente. Ao término de cada PAI, as plantas foram tratadas com inseticida piretróide (Cipermetrina nortox 250 EC) para evitar a perpetuação de ninfas, sendo o tratamento repetido após 7 dias.

Nos experimentos de caracterização da transmissão, as mesmas gaiolas e ambientes descritos acima foram utilizados para aquisição e inoculação do MaYMV. Em todos os experimentos ou eventos de perpetuação de isolados, as plantas inoculadas foram mantidas por até 45 dias em telado livres de insetos vetores para observação de sintomas e coleta de amostras foliares para testes de RT-PCR, visando confirmar a infecção viral e determinar as taxas de transmissão.

3.4. Caracterização da eficiência e persistência de transmissão de MaYMV por *R. maidis*

A persistência da transmissão de MaYMV por *R. maidis* foi avaliada em ensaios envolvendo a aquisição viral por ninfas de últimos instares e adultos, seguida da avaliação das taxas de transmissão para plantas saudias e detecção do vírus por RT-PCR nos afídeos, em períodos sucessivos após a aquisição. Para isso, cerca de 400 ninfas de últimos instares e adultos, todos provenientes da colônia livre de vírus do laboratório, foram submetidos a um PAA de 2 dias em plantas-fonte de vírus (20-30 dias depois de inoculadas), seguido de um PAI de 1 dia em plantas de milho saudias (plantas-teste), confinando-se 20 indivíduos por planta. Após o primeiro PAI, os insetos foram transferidos para outro PAI de 1 dia em novas plantas saudias, e assim sucessivamente até a morte da maioria dos indivíduos, mantendo-se o número de 20 indivíduos por planta-teste e inoculando-se pelo menos duas plantas por tratamento. Para que todos os afídeos fossem recuperados da planta-teste após um PAI, pequenas gaiolas foram confeccionadas para restringir o alcance do pulgão à uma área foliar (Figura 1). As gaiolas foram construídas com uma placa de isopor na base e um copo de acrílico transparente, restringindo-se a área de acesso do pulgão à planta. A folha de milho foi inserida entre o copo e a base de isopor, os quais foram envolvidos com fita adesiva junto a um palito de madeira, para fechamento da gaiola e sustentação da planta. O copo de acrílico recebeu uma espuma na sua boca para não ferir as folhas de milho. Para todos os ensaios envolvendo estudo de eficiência ou persistência de transmissão foram utilizadas as gaiolas individuais.



Figura 1. Gaiolas de acrílico elaboradas nesse trabalho para uso em ensaios de transmissão e persistência. Os afídeos foram confinados sobre folhas de milho. A gaiola de acrílico apresenta uma base isopor, as quais são coladas com auxílio de fita adesiva. Para evitar a quebra da folha, a gaiola foi sustentada com palito de madeira.

As ninfas jovens produzidas durante cada período foram eliminadas. Os controles negativos foram representados por quatro plantas saudáveis expostas no primeiro PAI a insetos adultos provenientes da colônia saudável e sem exposição prévia a plantas infectadas, e por quatro plantas não expostas a insetos em cada PAI.

Os ensaios de eficiência e persistência de transmissão por *R. maidis* descritos a seguir foram conduzidos utilizando-se diferentes condições de planta-fonte e de planta-teste, a fim de avaliar o impacto da presença ou não do vírus SCMV, muito comum a campo (inclusive em infecções mistas com MaYMV), na transmissão do MaYMV.

3.4.1 Planta-fonte com infecção mista (MaYMV e SCMV)

Os primeiros ensaios contaram com plantas-fontes mistas, contendo SCMV e MaYMV, cujas infecções foram comprovadas por sintomas, para o SCMV, e por RT-PCR, para ambos os vírus. Tais plantas-fontes com infecções mistas foram oferecidas para aquisição por 2 dias. Nos PAIs sucessivos de 1 dia, utilizaram-se 10 afídeos por planta-teste.

3.4.2 Planta-fonte com infecção simples de MaYMV

A outra modalidade de ensaio contou com plantas-fontes infectadas apenas por MaYMV. Essas não contavam com sintomas foliares e a infecção simples foi confirmada por RT-PCR convencional. Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste durante os PAIs.

3.4.3 Planta-fonte com infecção simples por MaYMV e ausência/presença de infecção prévia por SCMV na planta-teste

Nesse ensaio a planta-fonte estava com infecção simples por MaYMV, confirmada por sintomas foliares e RT-PCR, e as plantas-teste foram divididas em dois tratamentos: a) sem inoculação mecânica de SCMV antes do PAI; e b) com inoculação mecânica de SCMV, efetuada 2 dias antes do PAI (Figura 2). Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste durante os PAIs.



Figura 2. Metodologia de inoculação mecânica de SCMV em plantas-teste de milho. A – Escolha de planta-fonte sintomática e com confirmação por RT-PCR convencional de infecção por SCMV. B – Aplicação de carbureto de silício para ferimento da folha da planta-teste. C – Aplicação de suspensão obtida com maceração de folha sintomática de planta-fonte de SCMV em solução tampão (água destilada + KH_2PO_4).

A inoculação mecânica de plantas-teste foi realizada com inóculo obtido a partir de plantas-fontes de SCMV avaliadas previamente via RT-PCR convencional e com sintomas claros de mosaico foliar. Uma porção de folha sintomática da planta-fonte foi macerada em uma solução tampão composta por água destilada e KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico) até a obtenção de uma suspensão esverdeada. As plantas-teste em estágio V1 receberam aplicação de carbureto de silício na folha expandida, seguida de aplicação manual da suspensão de inóculo com movimentos circulares na folha, a fim de causar ferimentos e facilitar a entrada do vírus na planta.

3.4.4 Aquisição em planta-fonte com infecção mista, seguida ou não de etapa de limpeza viral

Por fim, o último ensaio contou com um PAA de 2 dias em plantas-fontes contendo SCMV e MaYMV, que foi seguido ou não por um período de limpeza viral dos estiletes (4 horas em folhas de milho sadio) antes dos PAIs consecutivos, nos quais foram utilizados 20 afídeos por planta-teste.

3.5. Transmissão de MaYMV por *R. maidis* para diferentes genótipos de milho e avaliação de sintomas

A eficiência da transmissão de MaYMV por *R. maidis* para diferentes genótipos de milho foi avaliada em experimento envolvendo a aquisição viral por ninfas de últimos instares e adultos de pulgões, seguido da avaliação das taxas de transmissão para plantas saudias de cada genótipo. Para isso, cerca de 400 ninfas de últimos instares e adultos, todos provenientes da colônia livre de vírus do laboratório, foram submetidos a um PAA de 2 dias em plantas com infecção mista de MaYMV e SCMV, confirmadas por sintoma visual, para SCMV, e RT-PCR convencional (20-30 dias depois de inoculadas), para ambos os vírus, seguido de uma limpeza viral do vírus não persistente SCMV em folha de milho sadia, destacada e alocada em placa de petri com ágar-água, e um PAI de 4 dias de duração, confinando-se 20 afídeos por planta-teste. Os controles negativos foram representados por quatro plantas saudias expostas no primeiro PAI a insetos adultos provenientes da colônia sadia, e por quatro plantas não expostas a insetos em cada PAI. Foram avaliados sete genótipos de milho, com ampla distância genética entre eles, variando entre híbridos e linhagens em desenvolvimento de milho, fornecidos pela empresa LongPing High-Tech Sementes & Biotecnologia LTDA.

A avaliação compreendeu a presença ou ausência da doença, por meio do diagnóstico molecular, por RT-PCR. Além disso, para cada genótipo de milho foram mensuradas as alturas de plantas comprovadamente negativas ou positivas para infecção por MaYMV, em dois estádios fenológicos, V6 e VT (pendoamento), seguindo a classificação de Magalhães e Durães (2006). Para o material LP2019 foram utilizadas seis plantas saudias e duas plantas infectadas; para o material LP2021 foram utilizadas duas plantas saudias e cinco plantas infectadas; o material LP2022.1 teve como representantes sete plantas saudias e três infectadas; o material LP2022.4 contou com nove plantas saudias e duas infectadas; enquanto o material LP2022.5 contou com sete plantas saudias e duas plantas infectadas. Os materiais LP2022.2 e LP2022.3 não tiveram suas alturas mensuradas, pois não houve plantas positivas para o MaYMV para esses tratamentos.

3.6. Transmissão de MaYMV por *R. maidis* para diferentes espécies de plantas

A eficiência da transmissão do vírus MaYMV por *R. maidis* foi avaliada testando-se plantas de milho, aveia e sorgo como plantas-teste. O experimento contou com a aquisição viral em planta-fonte de milho com infecção mista por MaYMV e SCMV, diagnosticada via

RT-PCR. Para isso, cerca de 400 ninfas de últimos instares e adultos, todos provenientes da colônia livre de vírus do laboratório, foram submetidos a um PAA de 2 dias em plantas-fonte infectadas (20-30 dias depois de inoculadas), seguido de um PAI de 4 dias de duração em plantas-teste, confinando-se 20 afídeos por planta-teste. Os controles negativos, para cada espécie de planta, foram representados por quatro plantas saudáveis expostas no primeiro PAI a insetos adultos provenientes da colônia sadia, e por quatro plantas não expostas a insetos em cada PAI.

3.7 Eficiência de transmissão de MaYMV por diferentes espécies de afídeos

A eficiência da transmissão de MaYMV por 4 espécies de afídeos que colonizam cereais, *R. maidis*, *R. padi*, *S. graminum* e *M. sorghi*, foi avaliada em experimento envolvendo um PAA de 2 dias por 400 ninfas de últimos instares e adultos em planta-fonte de milho com infecção mista de MaYMV (confirmada por RT-PCR) e SCMV (20-30 dias pós-inoculadas), apresentando sintomas de mosaico, seguido da inoculação em plantas saudáveis de milho em estágio V2 durante um PAI de 5 dias, confinando-se 20 afídeos/planta-teste. Após o PAI, as plantas foram submetidas a um tratamento com inseticida. Os controles negativos foram representados por quatro plantas saudáveis expostas no primeiro PAI a afídeos adultos provenientes da colônia sadia, e por quatro plantas não expostas a insetos em cada PAI.

As plantas resultantes do ensaio foram mantidas por 45 dias em casa de vegetação com tela antiáfida para extração do RNA e confirmação da infecção por MaYMV pela técnica do RT-PCR.

3.8 Eficiência de transmissão de MaYMV a partir de infecções mistas com outros vírus e/ou mollicutes em plantas de milho no campo

Plantas de milho no campo infectadas por mais de um patógeno (vírus e/ou mollicutes), confirmadas por extração de RNA e DNA seguida de RT-PCR ou PCR, foram utilizadas como plantas-fontes para um PAA de 2 dias por cerca de 400 ninfas de últimos instares e adultos de *R. maidis*. As plantas-fonte apresentavam infecção mista, diagnosticadas molecularmente, com ao menos dois dos seguintes patógenos: MSMV (maize striate mosaic virus), MRFV (maize rayado fino virus), SCMV, MaYMV, CSS (corn stunt spiroplasma) e MBSP (maize bushy stunt phytoplasma).

Em seguida foi feita a inoculação em plantas saudias de milho em estágio V2, durante um PAI de 4 dias, confinando-se 20 afídeos/planta-teste. Os controles negativos foram representados por quatro plantas-teste saudias expostas no primeiro PAI a insetos adultos provenientes da colônia sadia, e por quatro plantas não expostas a insetos em cada PAI.

As plantas resultantes do ensaio foram mantidas por 45 dias em casa de vegetação com tela antiáfida para extração do RNA e confirmação da infecção pelo vírus por RT-PCR.

3.9. Detecção molecular de vírus nas plantas e afídeos

Amostras de plantas e afídeos com suspeita de infecção por MaYMV ou SCMV, foram submetidas à extração de RNA com Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA), seguindo as recomendações do fabricante (Figura 3), e em seguida foram submetidas ao processo de transcrição reversa para obtenção de cDNA (AMV Reverse Transcriptase - Promega). As amostras de cDNA obtidas foram submetidas a RT-PCR convencional com primers específicos para MaYMV (MaYMVP2F/MaYMVP2R) e SCMV (SCMV5'UTR e SCMVHCPR), como descrito por Gonçalves et al. (2020).

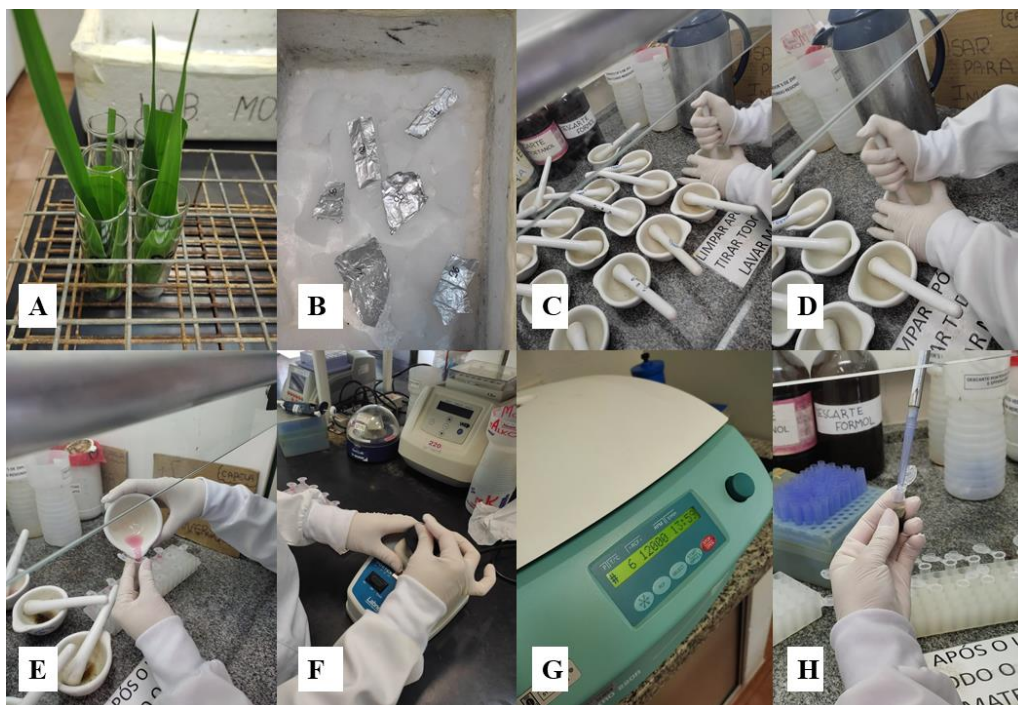


Figura 3. Metodologia de extração de RNA de plantas e afídeos. A – Coleta de folhas de plantas sintomáticas. B – Armazenamento das folhas em papel alumínio e gelo, para evitar a degradação do RNA. C e D – maceração do material em nitrogênio líquido. E – Adição de trizol para rompimento das células. F – Etapa de agitação para exposição de todas as células aos reagentes de extração de material genético. G – Centrifuga para separação do material vegetal dispensável (parede celular, fibras, etc.) e RNA. H – Coleta do RNA.

As amostras de plantas com suspeita de infecção por MRFV tiveram seu RNA extraído e foram diagnosticadas por RT-PCR; enquanto as amostras com suspeita de infecção por MSMV, CSS ou MBSP tiveram seu DNA extraído e foram diagnosticadas por PCR.

O conjunto de primers MFRV9F e MRFV10R foram desenhados e utilizados para a detecção do MRFV de acordo com o estudo de Hammond et al. (1997).

Os primers específicos utilizados para a detecção do MSMV foram MSMVF1 (5'-CCDAACDDAGTGGAAGAACA-3') e MSMVR1 (5'-TCGGGCCACACA ACTACTTC-3'), descritos por Vilanova et al., (2022).

O conjunto de primers desenhados para a detecção do MBSP foram de acordo com a sequência definida por Smart et al. (1996). E para a detecção do CSS utilizou-se os primers CSSF2 e CSSR6, de acordo com o estudo de Barros et al. (2001).

Os materiais vegetais com suspeita de infecção por vírus de RNA, além da extração com Trizol, após a precipitação do RNA, foram submetidos a uma limpeza com álcool. Adicionou-se 1000 ul de Etanol 75% e, após passar pelo vórtex, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 7500 RPM (à 4° C). O sobrenadante foi descartado e no pellet obtido, adicionou-se 100 ul de água ultra pura, 300 ul de etanol 100% e 10 ul de acetato de sódio (3M) por amostra. O pellet foi mantido nessa solução por 12 horas e centrifugado a 1400 RPM por 30 minutos (à 4 °C). O sobrenadante foi descartado novamente e uma terceira fase ocorreu, adicionando-se 500 ul de etanol 75% e centrifugando a amostra a 1400 RPM por 18 minutos (à 4° C). O sobrenadante foi descartado e o pellet da amostra foi ressuscitado em água ultra pura para uso futuro das amostras na etapa de RT-PCR.

Já os materiais vegetais com suspeita de infecção por vírus ou mollicutes de DNA foram submetidos a extração seguindo o protocolo CTAB descrito por Ausubel et al. (1997).

3.10. Análise dos resultados

Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com significância de 5%, para verificar a existência de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Quando existentes, realizou-se o teste de comparação de médias Tukey também a 5%. O programa computacional Rstudio foi utilizado para a análise estatística.

A probabilidade de transmissão por um único afídeo foi calculada em todos os ensaios que contaram com 10 ou 20 afídeos para inoculação por planta-teste, usando a fórmula de Swallow (1985).

$$P = 1 - (1 - I)^{1/k}$$

Onde I é a proporção de plantas infectadas, em decimal, para cada PAI e k é o número de insetos em cada PAI por planta.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da eficiência e persistência de transmissão de MaYMV por *Rhopalosiphum maidis* (Fitch)

4.1.1 Planta-fonte com infecção mista (MaYMV e SCMV)

Neste primeiro ensaio não houve diagnose molecular nas plantas-testes de milho inoculadas, apenas diagnose visual dos sintomas foliares iniciais. Observaram-se plantas-teste com sintomas de mosaico em todas as repetições do primeiro período de acesso à inoculação (PAI) por *R. maidis*, e em uma repetição do segundo PAI (período de 24 a 48 h após a aquisição). Baseando-se no percentual de plantas sintomáticas, as taxas de transmissão variaram de 20 a 29% no primeiro PAI e de 0 a 3,2% no segundo PAI (Tabela 1). Já no terceiro e quarto PAI não ocorreu transmissão. As plantas-teste utilizadas para controle de estufa (sem exposição ao inseto vetor) e controle de criação (expostas a afídeos advindos da colônia de laboratório) não apresentaram sintomas foliares.

Tabela 1. Taxas de transmissão do sugarcane mosaic virus por *Rhopalosiphum maidis* em períodos sucessivos (24 h) de acesso à inoculação (PAI) após a aquisição por 2 dias em planta de milho com infecção mista por sugarcane mosaic virus e maize yellow mosaic virus

PAI	Tempo (dias) após aquisição	Repetições do ensaio ^a			Total ^a	P ^b
		I	II	II		
1	0-1	12/41 (29,3)	9/40 (22,5)	6/30 (20,0)	27/111 (24,3)	0,027
2	1-2	1/31(3,2)	0/30 (0)	0/15 (0)	1/76 (1,3)	0,001
3	2-3	0/19 (0)	0/16 (0)	0/8 (0)	0/43 (0)	0
4	3-4	0/14 (0)	0/8 (0)	- ^c	0/22 (0)	0

^aDados de número de plantas de milho que mostraram sintomas de mosaico comum sobre o total de plantas-teste inoculadas. Valores entre parênteses representam o percentual de plantas sintomáticas. Utilizaram-se 10 afídeos por planta-teste.

^bP: probabilidade média de transmissão por um único afídeo, estimada com base na fórmula: $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, em que I é a proporção de plantas-teste infectadas e k é o número de afídeos confinados por planta-teste (Swallow 1985).

^cNão foram efetuadas inoculações devido ao número insuficiente de afídeos sobreviventes.

4.1.2 Planta-fonte com infecção simples de MaYMV

No ensaio com planta-fonte contendo infecção simples de MaYMV, confirmado por diagnose molecular, foi possível realizar 6 dias de inoculação consecutivos, observando-se transmissão de MaYMV até o quinto dia após o período aquisição (Tabela 2). As taxas de transmissão, baseando-se nos percentuais de plantas-teste positivas para MaYMV pelo teste de RT-PCR, variaram de 14 a 67%, sendo que a maior taxa foi alcançada no quinto PAI. Os quatro PAIs anteriores apresentaram taxa de transmissão entre 14,3 e 27,8%. Apesar da transmissão ocorrer por até 5 dias e em taxas em torno de 20%, nenhuma planta apresentou sintoma foliar, assim como a planta-fonte utilizada.

Tabela 2. Taxas de transmissão por *Rhopalosiphum maidis* em períodos sucessivos (24h) de acesso à inoculação (PAI), após a aquisição por 2 dias em planta de milho com infecção simples por maize yellow mosaic virus

PAI	Tempo (dias) após aquisição	Plantas c/ mosaico ^a	Plantas c/ MaYMV ^a	Probabilidade de transmissão por indivíduo (<i>P</i>) ^b	Deteção de MaYV em afídeos ^c
-	0	- ^d	-	-	1/1
1	0-1	0/37 (0)	9/37 (24,3)	0,014	-
2	1-2	0/18 (0)	5/18 (27,8)	0,016	1/2
3	2-3	0/7 (0)	1/7 (14,3)	0,007	1/1
4	3-4	0/5 (0)	1/5 (20,0)	0,011	-
5	4-5	0/3 (0)	2/3 (66,7)	0,054	1/2
6	5-6	0/1 (0)	0/1 (0)	0	1/1

^aNúmero de plantas de milho que mostraram sintomas de mosaico comum, ou que foram positivas para MaYMV por RT-PCR, sobre o total de plantas-teste inoculadas. Valores entre parênteses representam os percentuais. Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste nos períodos de inoculação.

^b*P*: probabilidade de transmissão de MaYMV por um único afídeo, estimada com base na fórmula: $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, em que *I* é a proporção de plantas-teste infectadas e *k* é o número de afídeos confinados por planta-teste (Swallow 1985).

^cCada amostra foi composta por um grupo de 10 afídeos

^dTraço indica período sem avaliação.

Aplicando-se a fórmula de Swallow (1985), a probabilidade de transmissão por um indivíduo no primeiro PAI foi de 1,4%; 1,6% para o segundo PAI; 0,7% para o terceiro PAI; 1,1% para o quarto PAI e 5,4% para o quinto PAI, decaindo para 0% no sexto e último PAI (Tabela 2).

Em nenhum dos PAIs adotados foi possível ultrapassar a probabilidade de 10% de transmissão, porém nota-se um aumento considerável no quinto PAI. No sexto PAI não foi possível detectar a transmissão de MaYMV, possivelmente por ter sido inoculada apenas uma planta-teste; porém, ainda detectou-se o vírus MaYMV nos afídeos (Tabela 2). O resultado sugere uma transmissão do tipo persistente, com circulação do vírus no corpo do inseto vetor. As plantas-teste utilizadas para controle de estufa e controle de criação não apresentaram

qualquer sintoma foliar e também não foi constatado a presença do MaYMV via RT-PCR convencional. Não houve diferença estatística para os resultados.

4.1.3 Planta-fonte com infecção simples de MaYMV e ausência/presença de infecção prévia de SCMV em plantas-teste (inoculação mecânica)

O tratamento com plantas-teste de milho livres de infecção prévia por SCMV contou com 2 repetições, sendo que o tratamento com infecção prévia de SCMV teve 4 repetições. As plantas-teste utilizadas no controle de estufa, para os 3 PAIs realizados, de todas as repetições, não apresentaram sintomas foliares de mosaico e foram negativas para MaYMV por RT-PCR. As plantas-teste utilizadas como controle de criação de afídeos não apresentaram sintomas foliares de mosaico e foram negativas na diagnose molecular para MaYMV.

No tratamento sem a inoculação mecânica prévia do SCMV nas plantas-teste de milho, observaram-se 2 plantas com sintomas foliares de mosaico no primeiro PAI da primeira repetição do ensaio, e 4 plantas com sintomas no segundo PAI (Tabela 3). Essas plantas, apesar de sintomáticas, não foram positivas para MaYMV, o que indica que houve uma inoculação acidental de SCMV durante o período de avaliação.

No tratamento com plantas-teste previamente inoculadas com SCMV, o sintoma de mosaico foliar esteve em evidência, nas 4 repetições realizadas. Na primeira e segunda repetição do ensaio, 100% das plantas apresentaram sintoma foliar, enquanto que na terceira repetição a incidência de sintomas não foi total somente no segundo PAI, em que se observou 83% de plantas sintomáticas. Para a quarta repetição do ensaio, os percentuais de plantas sintomáticas foram 93, 100 e 86% no primeiro, segundo e terceiro PAIs, respectivamente.

A inoculação mecânica prévia de plantas-teste com SCMV não resultou em aumento ou redução significativa na taxa de transmissão de MaYMV em relação ao tratamento com plantas-teste livres de vírus. De todas as repetições e PAIs do tratamento com inoculação prévia de SCMV, 92 plantas-teste (de um total de 96 inoculadas) apresentaram sintoma de mosaico foliar, mas somente 10 plantas (10,4%) apresentaram confirmação molecular para MaYMV (Tabela 3). Já no tratamento sem inoculação prévia de SCMV, 9 (13,2%) de um total 68 plantas-teste inoculadas em todas as repetições e PAIs mostraram-se infectadas por MaYMV no tratamento em que as plantas-teste estavam previamente livres de vírus. As estimativas de probabilidade de transmissão por um único afídeo também não variaram significativamente entre os dois tratamentos, com valores próximos a 1% para o total de plantas inoculadas nas diferentes repetições de cada tratamento, no primeiro e segundo PAIs

(Tabela 3). Observa-se que no último PAI houve transmissão apenas no tratamento com plantas-teste previamente livres de vírus, mas foi apenas uma planta em um total de 13 inoculadas nas duas repetições.

Não houve diferença estatística, a 5% de significância, nas probabilidades de transmissão por um único afídeo entre os dois tratamentos, para o primeiro ($p = 0,6861$), segundo ($p = 0,4824$) e terceiro ($p = 0,1778$) PAIs. No entanto, observa-se uma tendência da probabilidade de transmissão por um único afídeo ser maior no segundo PAI, para ambos os tratamentos.

Tabela 3. Taxas de transmissão de maize yellow mosaic virus (MaYMV) por *Rhopalosiphum maidis* para plantas-teste de milho com ou sem inoculação mecânica prévia de sugarcane mosaic virus (SCMV), em períodos sucessivos de acesso à inoculação (PAI) após a aquisição por dois dias em planta de milho com infecção simples por MaYMV. Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste nos períodos de inoculação

Condição da planta-teste	Repetição	PAI (dias após aquisição)		
		1 (0-1)	2 (1-2)	3 (2-3)
Livre de vírus	I	2/15 (0,0071) ^b	2/12 (0,0091)	0/8 (0)
	II	2/15 (0,0071)	2/13 (0,0083)	1/5 (0,011)
Total		4/30 (0,0071)	4/25 (0,0087)	1/13 (0,0040)
Previamente infectada com SCMV ^a	I	1/10 (0,0053)	3/3 (1)	0/1 (0)
	II	2/8 (0,0143)	0/4 (0)	0/2 (0)
	III	0/15 (0)	3/12 (0,0143)	0/9 (0)
	IV	0/15 (0)	1/10 (0,0053)	0/7 (0)
Total		3/48 (0,0032)	7/29 (0,0137)	0/19 (0)

^aPlantas-teste de milho foram inoculadas mecanicamente com SCMV, 2 dias antes de cada PAI.

^bNúmero de plantas de milho positivas para MaYMV, sobre o total de plantas-teste inoculadas. Valores entre parênteses representam a probabilidade de transmissão por um único afídeo (P), estimada com base na fórmula: $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, em que I é a proporção de plantas-teste infectadas e k é o número de afídeos confinados por planta-teste (Swallow 1985).

4.1.4 Planta-fonte com infecção mista de MaYMV e SCMV e etapa de limpeza

Conforme esperado, observaram-se plantas-teste com sintomas foliares de mosaico comum típicos de SCMV, que é um vírus de transmissão não persistente, somente no primeiro PAI do tratamento sem limpeza viral dos afídeos após a aquisição (Tabela 4). As plantas-teste do tratamento com limpeza de estilete dos afídeos não apresentaram sintoma foliar de mosaico comum nos PAIs das três repetições do ensaio. No tratamento sem limpeza de estilete, para a primeira repetição 50% das plantas apresentaram sintomas no primeiro PAI, enquanto nos outros PAIs não houve sintoma algum. Na segunda repetição o mesmo comportamento se repetiu, com 50% das plantas sintomáticas no primeiro PAI e nenhuma sintomática nos demais. Já na terceira repetição, pouco mais de 11% das plantas apresentaram sintomas no primeiro PAI, enquanto nos demais não houve sintomas foliares de mosaico.

Para o tratamento com limpeza do SCMV após a aquisição, as taxas de transmissão de MaYMV foram de 11 a 30% de plantas infectadas para o primeiro PAI; 0 a 20% para o segundo PAI; não havendo transmissão no terceiro PAI em nenhuma repetição (Tabela 4). Já para o tratamento sem limpeza viral após o PAA, as taxas de transmissão de MaYMV foram de 10 a 22% no primeiro PAI; se mantiveram de 0 a 20% no segundo PAI; e também não houve transmissão no terceiro PAI. Na média, para o primeiro PAI ambos os tratamentos apresentaram transmissão de 13,8%, e para o terceiro PAI não houve transmissão. Só houve alteração para o segundo PAI, sendo que o tratamento com limpeza gerou 6,67% das plantas infectadas por MaYMV, enquanto o tratamento sem limpeza gerou 5,88% das plantas com MaYMV; sem diferenças estatísticas.

As plantas-teste utilizadas como controle de estufa para os três PAIs, em todas as repetições, não apresentaram sintoma foliar de mosaico e foram negativas para MaYMV na diagnose molecular realizada, via RT-PCR. As plantas-teste utilizadas como controle de criação para as três repetições também foram negativas na diagnose molecular para MaYMV e não apresentaram sintomas foliares de mosaico.

Tabela 4. Taxas de transmissão por *Rhopalosiphum maidis* em períodos sucessivos de acesso à inoculação (PAIs) em plantas-teste de milho, após um período de aquisição (PAA) de 2 dias em planta-fonte com infecção mista por maize yellow mosaic virus (MaYMV) e sugarcane mosaic virus (SCMV), seguido ou não de limpeza estiletar do SCMV. Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste nos períodos de inoculação

Tratament o dos afídeos após o PAA ^a	Repetição	PAI (dias após a aquisição)					
		1 (0-1)		2 (1-2)		3 (2-3)	
		Plantas com SCMV	Plantas com MaYMV	Plantas com SCMV	Plantas com MaYMV	Plantas com SCMV	Plantas com MaYMV
Com limpeza viral	I	0/9 (0) ^b	1/9 (0,6)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/1 (0)	0/1(0)
	II	0/10 (0)	0/10 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)
	II	0/10 (0)	3/10 (1,7)	0/5 (0)	1/5 (1,1)	0/2 (0)	0/2 (0)
	Total	-	0/29 (0)	4/29 (0,7)	0/15 (0)	1/15 (0,1)	0/6 (0)
Sem limpeza viral	I	5/10 (3,4)	1/10 (0,5)	0/5 (0)	1/5 (1,1)	0/1 (0)	0/1 (0)
	II	5/10 (3,4)	1/10 (0,5)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)
	III	1/9 (0,6)	2/9 (1,2)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)
Total	-	6/29 (1,1)	4/29 (0,7)	0/17 (0)	1/17 (0,1)	0/6 (0)	0/6 (0)

^aEntre o PAA e o primeiro PAI, os afídeos foram submetidos ou não a um período de alimentação de 4 h dos afídeos em plantas sadias (limpeza do SCMV).

^bNúmero de plantas de milho que mostraram sintomas de SCMV, ou que foram positivas para MaYMV por RT-PCR, sobre o total de plantas-teste inoculadas. Valores entre parênteses representam a probabilidade de transmissão de MaYMV por um único afídeo (P), estimada com base na fórmula: $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, em que I é a proporção de plantas-teste infectadas e k é o número de afídeos confinados por planta-teste (Swallow 1985). O resultado da fórmula está apresentado em forma de porcentagem (%). Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste nos períodos de inoculação.

Aplicando a fórmula de Swallow (1985) e considerando-se que foram usados 20 afídeos por planta-teste, obtve-se uma estimativa de probabilidade de transmissão por indivíduo de 0,75% e 0,10% no primeiro e segundo PAIs, respectivamente, para o total de plantas inoculadas nas três repetições de ambos os tratamentos (Tabela 4). Para o terceiro PAI, não houve transmissão em ambos os tratamentos. Comparando-se as probabilidades de transmissão por indivíduos entre os dois tratamentos, não houve diferença estatística no primeiro ($p = 0,9546$), segundo ($p = 1$) e terceiro PAI. A similaridade em taxas de transmissão de MaYMV entre os dois tratamentos demonstra que a presença de SCMV nos estiletes do afídeo vetor não influencia o sucesso de transmissão de MaYMV por *R. maidis*, o que é esperado pelo fato de os dois vírus terem modos de transmissão distintos.

Os resultados mostram que o MaYMV não se perde no processo de limpeza viral dos estiletes de *R. maidis* após a aquisição, evidenciando que esse vírus não está limitado aos estiletes do afídeo, apresentando um modo de transmissão persistente circulativa. Uma amostra de 10 afídeos foi separada para constatação da presença do MaYMV no inseto em dois momentos: após o período de acesso à aquisição de 48 horas, para confirmação da aquisição do vírus e após o período de limpeza estiletar, para constatação de que o vírus

permanece no inseto após a alimentação em folha de planta sadia por 4 horas. As duas amostras foram testadas via RT-PCR e ambas foram positivas para MaYMV.

4.2 Eficiência de transmissão de MaYMV por *R. maidis* em diferentes genótipos de milho e avaliação de sintomas

A taxa de transmissão de MaYMV por *R. maidis* variou entre os genótipos de milho avaliados como planta-teste. O híbrido LP2021, que foi utilizado como padrão nos demais ensaios dessa dissertação, apresentou a maior taxa de infecção (71%). Os genótipos LP2022.2 e LP2022.3 não apresentaram nenhuma planta-teste positiva para MaYMV, enquanto os materiais LP2019, LP2022.1, LP2022.4 e LP2022.5 apresentaram taxas de transmissão de 25, 41, 18 e 30%, respectivamente (Tabela 5).

A partir da análise pelo teste de Tukey a 5% de significância, os materiais LP 2021 e LP2022.1 apresentaram taxas de transmissão que diferiram estatisticamente de todos os outros materiais, seguidos pelo LP2019, LP2022.4 e LP2022.5, os quais apresentaram menor transmissibilidade quando comparados ao primeiro grupo, não diferindo entre si. A transmissão não ocorreu nos materiais LP2022.2 e LP2022.3.

Aplicando-se a fórmula de Swallow (1985), as probabilidades de transmissão por um afídeo variaram de 1 a 6% (Tabela 5).

Tabela 5. Taxas de transmissão de maize yellow mosaic virus (MaYMV) por *Rhopalosiphum maidis* para diferentes genótipos de milho durante um período de acesso à inoculação de 4 dias (20 afídeos/planta-teste), após um período de acesso à aquisição de 2 dias em planta-fonte coinfectada com sugarcane mosaic vírus (SCMV), seguido de uma limpeza de 4 horas em folha sadia de milho

Genótipo	Proporção de plantas sintomáticas ^a	Proporção de plantas positivas para MaYMV ^b	Taxa de infecção de MaYMV (%) ^c
LP2019	0/8	2/8 (0,014)	25b
LP2021	0/7	5/7 (0,06)	71a
LP2022.1	0/12	5/12 (0,026)	41a
LP2022.2	0/10	0/10 (0)	0b
LP2022.3	0/10	0/10 (0)	0b
LP2022.4	0/11	2/11 (0,01)	18b
LP2022.5	0/10	3/10 (0,018)	30b

^aNúmero de plantas que mostraram sintomas de SCMV sobre o total de plantas-testes inoculadas, aos 30 e 48 dias da inoculação.

^bNúmero de plantas de milho que foram positivas para MaYMV por RT-PCR convencional após 16 dias da inoculação, sobre o total de plantas-teste inoculadas. Valores entre parênteses representam a probabilidade de transmissão de MaYMV por um único afídeo (P), estimada com base na fórmula: $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, em que I é a proporção de plantas-teste infectadas e k é o número de afídeos confinados por planta-teste (Swallow 1985). Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste nos períodos de inoculação.

^cTaxa de infecção de MaYMV em plantas-teste de milho apresentada em porcentagem. Percentuais seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Os genótipos foram avaliados desde o estágio V4 até o estágio VT (pendoamento), segundo o sistema de identificação de estádios vegetativos de Magalhães e Durães (2006), e as plantas-teste não apresentaram qualquer sintoma foliar. Com relação à altura de planta no estágio V6, não houve diferença estatística entre plantas de um mesmo genótipo que testaram positivamente e negativamente para MaYMV por RT-PCR (Figura 4a). No estágio de pós pendoamento, observou-se diferença estatística significativa apenas para o material LP2021, que apresentou plantas positivas para MaYMV mais altas quando comparadas às plantas sadias; esse foi o material de maior suscetibilidade ao vírus com relação à eficiência de transmissão (Tabela 5). Para os genótipos LP2022.1 e LP2022.5 não houve diferença estatística, porém as plantas positivas para MaYMV mostraram a tendência de maior porte quando comparadas às plantas negativas para o vírus, sendo que as positivas foram 3,8% e 12,8% mais altas, respectivamente. O material LP2022.4 variou em 1% na altura mediante as diferentes condições das plantas e o material LP2019 variou em 9%, sendo que a média mais alta foi atribuída às plantas negativas, sendo o único material genético com esse comportamento (Figura 4b).

Os coeficientes de variação foram de 7,56 a 16,22% para o estágio fenológico V6 e variaram de 5,21 a 20,46% para o estágio VT. O desvio padrão variou de 0,05 a 0,1 para o estágio V6 e de 0,12 a 0,26 em VT (Tabela 6).

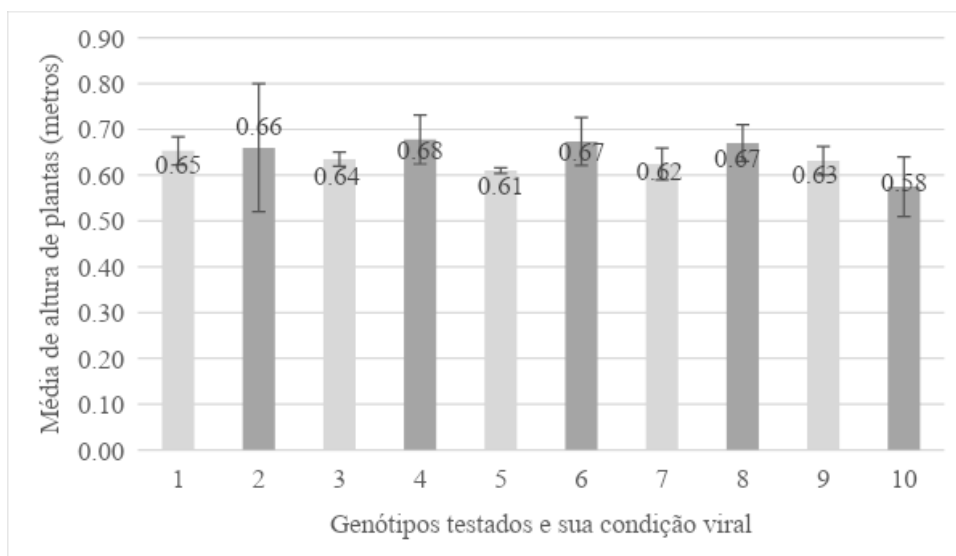


Figura 4a. Altura média de plantas no estágio fenológico V6 (Magalhães e Durães, 2006) de diferentes genótipos de milho, que testaram positivamente ou negativamente para maize yellow mosaic vírus (MaYMV) por RT-PCR. As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média. Não houve diferença estatística entre plantas positivas e negativas para os genótipos avaliados, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

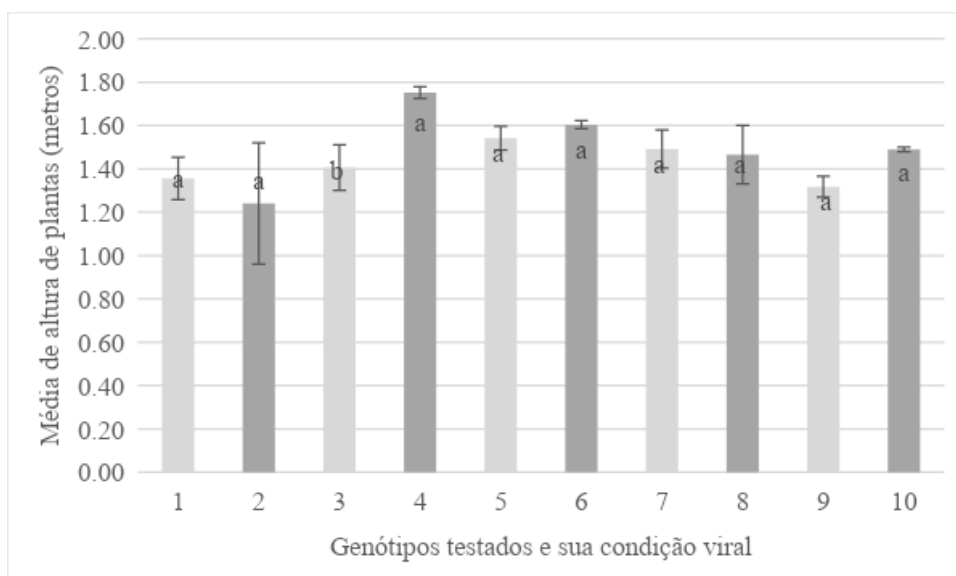


Figura 4b. Altura média de plantas no estágio de pendoamento (VT) de diferentes genótipos de milho, que testaram positivamente ou negativamente para maize yellow mosaic vírus (MaYMV) por RT-PCR. As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média. As médias de plantas positivas e negativas de um mesmo genótipo com a mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6. Resultados da análise estatística para comparação de altura média nos estádios fenológicos V6 e pendoamento (VT), entre plantas do mesmo genótipo que testaram positivamente e negativamente por RT-PCR

Genótipo de milho	Estádio fenológico	Parâmetro estatístico ^a			
		F ^b	P ^c	CV (%) ^d	DP ^e
LP2019	V6	0,0059	0,9412	16,22	0,09
	VT	0,2694	0,6223	20,46	0,26
LP2021	V6	0,2280	0,6531	16,17	0,1
	VT	23,164	0,0048	5,21	0,18
LP2022.1	V6	3,7299	0,0895	7,56	0,05
	VT	0,4962	0,5012	8,16	0,12
LP2022.4	V6	0,3387	0,5748	15,82	0,09
	VT	0,01660	0,9003	17,44	0,25
LP2022.5	V6	0,7173	0,4250	13,43	0,08
	VT	3,3287	0,1108	8,72	0,13

^aAnálise estatística feita em Rstudio com 5% de significância.

^bValor F calculado (média das variâncias dentro do grupo).

^cValor P (probabilidade de significância).

^dCoefficiente de variação em porcentagem.

^eDesvio padrão.

Coefficientes de variação abaixo de 10% são aceitos como baixos, entre 10 e 20% médios, entre 20 e 30% altos e acima de 30% são considerados muito altos (Gomes, 1990). Com isso, em V6 e VT considera-se os coeficientes alcançados de baixos a médios.

4.3 Eficiência de transmissão de MaYMV por *R. maidis* para diferentes espécies de plantas

Verificou-se a transmissão de MaYMV para plantas-teste de milho e de aveia. As taxas de transmissão foram de 18, 0 e 33% para milho, sorgo e aveia, respectivamente (Tabela 7). As probabilidades de transmissão por indivíduo foram de 1% em milho e de 2% em aveia, indicando uma baixa eficiência de transmissão do vírus por *R. maidis* para as duas espécies hospedeiras.

Apesar da planta-fonte de milho apresentar infecção mista de SCMV e MaYMV, nenhuma espécie das plantas-teste apresentaram sintoma de mosaico.

Tabela 7. Taxas de transmissão de maize yellow mosaic virus (MaYMV) por *Rhopalosiphum maidis* para plantas-teste de milho, aveia e sorgo durante um período de acesso à inoculação de 4 dias, após um período de acesso à aquisição de 2 dias em planta-fonte de milho com infecção mista de MaYMV e SCMV

Espécie vegetal	Proporção de plantas positivas por RT-PCR^a	Taxa de transmissão (%)^b	Probabilidade de transmissão por indivíduo (P)^c
Milho	2/11	18	0,01
Sorgo	0/12	0	0
Aveia	4/12	33	0,02

^aNúmero de plantas de plantas-teste que foram positivas para MaYMV, sobre o total de plantas-teste inoculadas.

^bTaxa de transmissão de MaYMV calculada com base no número de plantas positivas para MaYMV e apresentada em formato de porcentagem.

^cProbabilidade de transmissão de MaYMV por um único afídeo (P), estimada com base na fórmula: $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, em que I é a proporção de plantas-teste infectadas e k é o número de afídeos confinados por planta-teste (Swallow 1985). Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste nos períodos de inoculação.

4.4 Caracterização da eficiência de transmissão de MaYMV por diferentes espécies de afídeos

As quatro espécies de afídeos transmitiram MaYMV para plantas-teste de milho, porém com baixa eficiência. Considerando-se os percentuais de plantas infectadas, as espécies *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) e *R. maidis* apresentaram taxas de transmissão um pouco mais elevadas que *Melanaphis sorghi* (Theobald) e *Schizaphis graminum* (Rondani). Com base nos totais de plantas avaliadas nas diferentes repetições e no número de 20 afídeos confinados por planta-teste, as probabilidades de transmissão de MaYMV por indivíduo (P) variaram de 0,16 (*S. graminum*) a 0,49% (*R. padi*) (Tabela 8). Os percentuais de plantas infectadas nas diferentes repetições do ensaio variaram de 0 a 25% para *R. maidis*, de 0 a 30% para *R. padi*, e de 0 a 10% para *S. graminum* e *M. sorghi*.

O SCMV foi transmitido apenas por *R. maidis* e *M. sorghi* (Tabela 8). Considerando-se o percentual de plantas infectadas no conjunto das repetições, a eficiência de transmissão também foi baixa, com probabilidade de transmissão por indivíduo estimada em 1,1% para ambas as espécies de afídeos.

Tabela 8. Taxas de transmissão por diferentes espécies de afídeos durante período de acesso à inoculação de 5 dias em plantas-teste milho, e após um período de acesso à aquisição de 2 dias (PAA) em planta-fonte com infecção mista por maize yellow mosaic vírus (MaYMV) e sugarcane mosaic vírus (SCMV)

Espécie vetora	Repetição	Proporção de plantas com SCMV ^a	Proporção de plantas com MaYMV ^b	Probabilidade de transmissão de MaYMV por indivíduo (P) ^c
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	1	0/16 (0)	0/16 (0)	0
	2	0/10 (0)	1/10 (10)	0,0053
	3	0/12 (0)	3/12 (25)	0,0143
	4	4/6 (67)	0/6 (0)	0
	5	1/4 (25)	0/4 (0)	0
	6	6/8 (75)	1/8 (12,5)	0,0067
	Total	11/56 (20)	5/56 (8,9)	0,0047
<i>Rhopalosiphum padi</i>	1	0/10 (0)	0/10 (0)	0
	2	0/10 (0)	3/10 (30)	0,0177
	3	0/12 (0)	0/12 (0)	0
	Total	0/32 (0)	3/32 (9,3)	0,0049
<i>Schizaphis graminum</i>	1	0/10 (0)	0/10 (0)	0
	2	0/10 (0)	1/10 (10)	0,0053
	3	0/12 (0)	0/12 (0)	0
	Total	0/32 (0)	1/32 (3,1)	0,0016
<i>Melanaphis sorghi</i>	1	0/4 (0)	0/4 (0)	0
	2	0/6 (0)	0/6 (0)	0
	3	4/10 (40)	1/10 (10)	0,0053
	Total	4/20 (20)	1/20 (5)	0,0026

^aNúmero de plantas-teste de milho com sintomas típicos de SCMV (mosaico comum), sobre o total de plantas-teste inoculadas. Entre parênteses têm-se a o percentual de plantas infectadas.

^bNúmero de plantas-teste de milho que testaram positivamente para MaYMV por RT-PCR, sobre o total de plantas-teste inoculadas. Entre parênteses têm-se o percentual de plantas infectadas.

^cProbabilidade de transmissão de MaYMV por um único afídeo (P), estimada com base na fórmula: $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, em que I é a proporção de plantas-teste infectadas e k é o número de afídeos confinados por planta-teste (Swallow 1985). Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste nos períodos de inoculação.

As plantas-teste utilizadas para controle de estufa em todas as repetições realizadas para as quatro espécies de afídeos não apresentaram sintoma foliar de mosaico e apresentaram resultado negativo para MaYMV, averiguado via RT-PCR. As plantas-teste utilizadas para controle de criações em laboratório, para todas as espécies, não apresentaram sintomas foliares e apresentaram resultados de PCR negativos para MaYMV.

4.5 Eficiência de transmissão de MaYMV a partir infecções mistas com outros vírus e/ou mollicutes em plantas de milho no campo

Neste ensaio foram avaliadas as taxas de transmissão de MaYMV por *R. maidis* a partir de plantas-fontes originadas de campo, com seis diferentes combinações de vírus e/ou mollicutes em infecção mista. As plantas-fontes contendo *Spiroplasma kunkelii* (corn stunt spiroplasma, CSS) ou fitoplasma do milho (maize bushy stunt phytoplasma, MBSP) não resultaram em nenhuma planta-teste positiva para MaYMV, porém apresentaram sintoma de mosaico quando o vírus SCMV estava presente na infecção mista (Tabela 9). Tentativas de transmissão (n = 3) a partir de plantas-fonte contendo três vírus (MSMV, SCMV e MaYMV) resultaram em 0 a 10% de plantas-teste infectadas com MaYMV e 40 a 70% de plantas com sintoma de mosaico, enquanto que a partir de plantas-fontes (n = 4) com quatro vírus (MSMV, SCMV e MRFV e MaYMV), verificou-se de 0 a 33% de plantas infectadas com MaYMV e 12,5 a 80% de plantas com mosaico comum (Tabela 9). Infecção mista de MaYMV e MSMV não resultaram em plantas-teste positivas para MaYMV.

Tabela 9. Taxas de transmissão por *Rhopalosiphum maidis* após um período de aquisição (PAA) de 2 dias em plantas-fonte de milho com infecções mistas com outros vírus e/ou mollicutes. Após o PAA, os afídeos foram submetidos a um PAI de 4 dias, com 20 afídeos por planta-teste

Combinação de patógenos na planta-fonte ^a	Repetição (planta-fonte)	Plantas-teste com sintoma de mosaico	Plantas-teste com MaYMV	Probabilidade de transmissão de MaYMV por indivíduo (<i>P</i>)
MaYMV + MSMV	1	6/10 (60) ^b	0/10 (0) ^c	0 ^d
MaYMV + MRFV + CSS	1	0/10 (0)	0/10 (0)	0
MaYMV + SCMV + MSMV + MRFV + CSS	1	2/7 (29)	0/7 (0)	0
MaYMV + SCMV + MSMV + MRFV + MBSP	1	6/10 (60)	0/10 (0)	0
MaYMV + MSMV + SCMV	1	4/10 (40)	0/10 (0)	0
	2	7/10 (70)	1/10 (10)	0,0053
	3	8/10 (80)	0/10 (0)	0
	Total	19/30 (63)	1/30 (3,33)	0,0017
MaYMV + MSMV + SCMV + MRFV	1	8/10 (80)	0/10 (0)	0
	2	1/8 (12,5)	0/8 (0)	0
	3	4/10 (40)	1/10 (10)	0,0053
	4	4/9 (44)	3/9 (33)	0,0201
	Total	17/37 (46)	4/37 (11)	0,0057

^aAmostras foliares da planta-fonte foram avaliadas por RT0PCR para seis patógenos: MaYMV, sugarcane mosaic virus (SCMV), maize striate mosaic virus (MSMV), maize rayado fino virus (MRFV), maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) e corn stunt Spiroplasma (CSS).

^bNúmero de plantas-teste de milho com sintoma típico de SCMV (mosaico comum), sobre o total de plantas-teste inoculadas. Entre parênteses têm-se a o percentual de plantas infectadas.

^cPlantas-teste de milho que testaram positivamente para MaYMV por RT-PCR, sobre o total de plantas-teste inoculadas. Entre parênteses têm-se a o percentual de plantas infectadas.

^dProbabilidade de transmissão de MaYMV por um único afídeo (*P*), estimada com base na fórmula: $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, em que *I* é a proporção de plantas-teste infectadas e *k* é o número de afídeos confinados por planta-teste (Swallow 1985). Utilizaram-se 20 afídeos por planta-teste nos períodos de inoculação.

5. DISCUSSÃO

Maize yellow mosaic virus (MaYMV) é um polerovirus descrito há poucos anos em milho, que tem sido relatado em várias regiões do mundo, incluindo o Brasil (Chen et al., 2016; Bernreiter et al., 2017; Gonçalves et al., 2017; Palanga et al., 2017; Yahaia et al., 2017). Entretanto, há poucas informações sobre a transmissão de MaYMV, além de *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) e *Rhopalosiphum padi* (L.) terem sido identificados como insetos vetores (Gonçalves et al., 2020; Stewart et al., 2020). Esta dissertação procurou aprofundar o conhecimento sobre as características de sua transmissão por afídeos, tais como persistência, eficiência de transmissão e gama de vetores, bem como o efeito de interações com sugarcane mosaic virus (SCMV) na planta e no inseto vetor sobre a transmissão.

Com base na literatura existente até o momento que antecedeu o início desta pesquisa, considerou-se que a diagnose visual seria eficiente para uma primeira triagem de plantas infectadas por MaYMV. Sintomas de avermelhamento e mosaico foram observados por autores como Gonçalves et al. (2020) e Stewart et al. (2020). Porém, 3 repetições de um primeiro ensaio (item 4.1.1) foram conduzidas em momentos diferentes, nas quais notaram-se sintomas foliares de mosaico apenas em plantas-teste de milho (*Zea mays* L.) dos primeiros períodos de acesso à inoculação (PAI). Considerando-se que no primeiro ensaio foi utilizada uma planta-fonte com infecção mista de SCMV e MaYMV, levantou-se a hipótese de que os sintomas estariam relacionados somente à infecção pelo SCMV, um potyvirus transmitido de forma não persistente e facilmente eliminado do estilete do inseto vetor após longos períodos de alimentação (Gonçalves et al., 2007), explicando a falta de sintomas até os últimos PAIs adotados.

Utilizando-se uma planta-fonte com infecção simples de MaYMV e adicionando-se a diagnose molecular na metodologia (ensaio do item 4.1.2), observou-se que em nenhum dos períodos de até seis dias de inoculação (PAIs) ocorreu a manifestação de sintomas foliares nas plantas-teste de milho. Porém, ao se analisar amostras foliares de plantas-teste por RT-PCR visando à detecção de MaYMV, notaram-se taxas de transmissão desse vírus variando de 14 a 67% nos sucessivos PAIs, com base na proporção de plantas infectadas, sendo que a maior taxa foi alcançada no quinto dia de inoculação. Também foi extraído o RNA de afídeos após 6 dias de inoculação, detectando-se MaYMV por RT-PCR no corpo dos insetos. A observação de transmissão por 5 dias após a aquisição e a detecção do vírus nos afídeos após o 6º PAI indicam uma transmissão do tipo persistente, com provável circulação do vírus no corpo do

vetor. A não ocorrência de transmissão no sexto dia após a aquisição sugere uma queda na concentração de partículas virais no inseto, de acordo com o modelo de transmissão circulativa não propagativa (Gray e Gildow, 2003); porém, os resultados do 6º PAI não são conclusivos pelo fato de ter sido inoculada apenas uma planta-teste, devido à baixa sobrevivência dos afídeos.

No ensaio em que se avaliou a transmissão de MaYMV por *R. maidis* para plantas-teste previamente inoculadas com SCMV (item 4.1.3), não foram observadas diferenças estatísticas e as porcentagens de transmissão foram muito semelhantes em relação ao tratamento com plantas-teste livres de infecção prévia por SCMV. Assim, não houve prejuízos nem incrementos na transmissão mediante a presença prévia na planta pelo vírus SCMV. Observou-se em estudos a campo a frequente presença de infecção mista por MaYMV e SCMV (Massawe et al., 2018; Stewart et al., 2021; Tanui et al., 2021), e a presente pesquisa indica ausência de competição entre os dois vírus no que se refere à infecção por MaYMV, após sua inoculação por afídeos em planta previamente infectada por SCMV. Além disso, os resultados do ensaio envolvendo o tratamento de limpeza viral após a aquisição (item 4.1.4) mostram que os dois vírus apresentam modos de transmissão distintos, sendo que a presença de SCMV nos estiletos de *R. maidis* (tratamento sem limpeza viral após a aquisição) não interfere na taxa de transmissão do MaYMV, um polerovirus cuja transmissão se caracterizou como persistente circulativa.

Os resultados dos diferentes ensaios mostraram uma baixa eficiência de transmissão de MaYMV por *R. maidis*. Estimando-se a eficiência de transmissão por indivíduo pela fórmula de Swallow (1985) e considerando-se que foram utilizados grupos de 10 ou 20 afídeos por planta-teste, observaram-se probabilidades de transmissão por afídeo em torno de 1% por dia de PAI, na maior parte dos PAIs realizados em que se utilizou um mínimo de três plantas-teste. Para SCMV, obteve-se uma estimativa de probabilidade de transmissão por indivíduo em torno de 2-3%, com base em totais de plantas inoculadas em dois ensaios (itens 4.1.1 e 4.1.4).

Nos ensaios de caracterização da eficiência e persistência da transmissão realizados na presente pesquisa, padronizaram-se PAIs com duração de apenas 1 dia. Stewart et al. (2020) observaram taxas mais elevadas de transmissão de MaYMV (62 a 100% de plantas infectadas para *R. maidis* e 31 a 51% para *R. padi*) fornecendo aos afídeos um PAI com duração de 7 dias, após um período de 3 dias de acesso à aquisição do vírus, um dia a mais do que adotado no presente trabalho. No presente trabalho, as taxas variaram de 0 a 66,7%, sendo a transmissão média em torno de 12%, considerando os ensaios dos itens 4.1.2; 4.1.3; 4.1.4;

que contaram com o vetor *R. maidis* e plantas de milho do mesmo genótipo. Como o MaYMV é um polerovirus provavelmente restrito ao floema, mais dias de acesso à aquisição e à inoculação proporcionam períodos mais longos de ingestão e de salivação em vasos de floema pelos afídeos, resultando, respectivamente, em maiores probabilidades de aquisição e de inoculação de partículas virais.

Neste trabalho, avaliou-se também o efeito da coinfeção de plantas com outros vírus e mollicutes do milho sobre a transmissão de MaYMV, realizando-se aquisição de vírus por *R. maidis* em folhas de plantas de milho infectadas com diferentes combinações de patógenos, incluindo SCMV (*Potyviriidae*), maize rayado fino virus, MRFV, (*Tymoviriidae*) e maize striate mosaic virus (MSMV) (*Geminiviriidae*), fitoplasma do milho (maize bushy stunt phytoplasma, MBSP) (*Candidatus Phytoplasma asteris*) e espiroplasma do milho (*Spiroplasma kunkeli*). Embora tenha sido um estudo exploratório, com poucas plantas-fonte avaliadas (1-4 plantas/combinção), verificou-se transmissão de MaYMV quando a planta-fonte apresentava infecções mistas com os outros vírus (SCMV, MRFV e MSMV), mas não na presença de espiroplasma ou de fitoplasma, ou somente do mastrevirus, os quais são restritos à vasos floemáticos, assim como o MaYMV, indicando que a combinação de patógenos na planta-fonte pode influenciar sua eficiência de transmissão por afídeos. Novos estudos devem ser conduzidos neste sentido, para verificar se há uma relação de sinergismo ou competição entre os patógenos em plantas de milho coinfectadas, com possíveis efeitos sobre a concentração de MaYMV e dos outros patógenos, bem como na expressão de sintomas.

Gonçalves et al. (2020) e Stewart e Willie (2021) apontaram maior severidade de sintomas em folhas de milho em plantas coinfectadas por MaYMV e outros vírus, como SCMV, maize chlorotic mottle virus (MCMV) ou ambos, gerando plantas com menores alturas (nanismo) e lesões vermelhas mais frequentes nas folhas. Outro ponto notado, é que em infecções triplas (MaYMV, MCMV e SCMV) foi identificado menor título viral de MCMV, porém ainda resultando em sintomas semelhantes a uma planta com alta titularidade viral. Também em 2021, Tanui e colaboradores apontaram altas taxas de incidência de infecção mista, sendo MaYMV combinado com SCMV e MCMV da família *Tombusviridae*, gênero *Machlomovirus*. Todas as amostras do último trabalho apresentaram MaYMV em conjunto com os outros dois vírus, compondo 56% das amostras avaliadas, e infecções simples só foram identificadas de SCMV. Massawe et al. (2018) também já havia identificado o MaYMV aparecendo majoritariamente em infecções mistas.

A falta de sintomas aparentes de mosaico em plantas com infecções simples de MaYMV neste trabalho motivou a realização de um ensaio de transmissão para diferentes genótipos de milho, os quais foram inoculados por *R. madis* a partir da aquisição em uma planta-fonte com infecção simples de MaYMV. Nenhum dos sete genótipos avaliados apresentou sintomas, sugerindo que a ausência de mosaico não está atribuída à tolerância de algum genótipo em particular, mas possivelmente a uma característica do isolado utilizado no presente estudo. As taxas de transmissão variaram de 0 a 71%, indicando que os genótipos podem diferir na suscetibilidade à infecção e/ou multiplicação do vírus. Porém, mesmo para o genótipo com a maior taxa de infecção por MaYMV, não foram observados sintomas foliares ou redução significativa no porte das plantas.

O MaYMV tem ampla distribuição geográfica no mundo, apresentando diferentes características, possivelmente devido a adaptações a condições locais. Na China e Índia, os sintomas relatados são de amarelecimento nas folhas de milho e trigo (*Triticum aestivum*, Lineu), formando um mosaico, podendo ocorrer nanismo das plantas (Nithya et al., 2021; Guo et al., 2022; Nithya et al., 2023). Porém, nos Estados Unidos os estudos conduzidos com esse vírus identificaram sintomas de avermelhamento nas bordas das folhas de milho (Stewart et al., 2020). No Brasil, Gonçalves et al. (2020) relataram sintomas de mosaico com pontuações cloróticas em infecções simples por MaYMV e necrose em coinfeção com o SCMV. No presente estudo, além de não terem sido detectados sintomas foliares aparentes, um dos genótipos avaliados mostrou maior altura de plantas no estágio de pendoamento (VT) quando infectado somente por MaYMV.

A particularidade biológica do isolado estudado nesta pesquisa sugere a ocorrência de variabilidade genética de MaYMV. O isolamento geográfico é um importante fator de alteração de estrutura genética de uma população viral. Estudos de Sun et al. (2021) sugerem que há três regiões geográficas que podem favorecer essa diferenciação entre as populações de MaYMV, que são China, África e América do Sul; tal hipótese é sustentada por uma árvore filogenética desenvolvida no estudo, que aponta diferenciações nas populações de diferentes locais e maior similaridade entre vírus encontrados em províncias próximas, dentro da China, por exemplo. As diferenças de clima e de germoplasma (de cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L., no caso dos referidos estudos) entre regiões podem favorecer a diferenciação dessas populações. Apesar da diferença entre países e continentes, os vírus encontrados na cultura de milho são muito similares a vírus encontrados na cultura da cana-de-açúcar em uma mesma região, o que pode ser justificado pelo cultivo simultâneo, em áreas próximas ou ainda subsequentes de ambas as culturas. A possibilidade de recombinação genética e o fluxo de

genes entre os vírus é baixo, provavelmente porque o MaYMV é transmitido por afídeos de maneira persistente circulativa, não tendo transmissão por semente ou de forma mecânica, o que diminui a chance desse tipo de evento (Sun et al., 2021). Apesar do baixo fluxo gênico, já se identifica uma variação no genoma de 0,1 a 8,9%. Mutações, deleções e adições vêm ocorrendo e em algumas proteínas têm sido mais recorrentes, como na região do genoma correspondente às proteínas P3 (capa proteica) e P5, responsáveis, dentre outros fatores, por limitar o vírus ao floema das plantas e desenvolver sintomas em plantas hospedeiras (Delfosse et al., 2021), além de garantir a interação com o vetor e o movimento sistêmico e localizado no floema; e na proteína P4 responsável pelo transporte do vírus na planta e pelo inseto a distâncias maiores, além do transporte de célula a célula (Sun et al., 2021). Identificaram cinco genes passando por seleção negativa ou de purificação relacionados a essa proteína. São as seleções naturais, conduzidas de formas diferentes nos variados ambientes, que podem gerar uma vasta diversidade de populações virais, tornando o vírus mais ou menos eficiente na infecção e, ainda, gerando sintomas diferentes ou ausentes, por todas as áreas onde ele foi identificado.

Os afídeos adquirem vírus da família *Solemoviridae* por meio de ingestão contínua de seiva do floema de plantas infectadas, sendo que do aparelho bucal a seiva ingerida passa pelo intestino, onde as partículas virais adquiridas atravessam o tecido epitelial e são transportadas, via hemocele, para as glândulas salivares acessórias. A partir de então, os afídeos inoculam partículas virais via salivação em tecidos floemáticos de plantas saudáveis, durante o processo de alimentação (Gray e Gildow, 2003).

Espécies do gênero *Luteovirus* (da família *Luteoviridae*) são transmitidas por mais de um gênero de afídeos, com eficiência de transmissão em torno de 16 a 38% (Bencharki, 2000). Esse gênero, apesar de não pertencer à mesma família que o MaYMV (*Solemoviridae*) ambos apresentam similaridade em suas capas proteicas (CPs), indicando origem filogenética comum (ICTV, 2023a), além de ambos serem circulativos no inseto vetor e restritos ao floema da planta. Com base no conjunto de repetições do estudo de gama de vetores de MaYMV conduzido nesta pesquisa, as taxas gerais de transmissão foram de 8,9% para a espécie *R. maidis*, 9,3% para *R. padi*, 3,1% para *Schizaphis graminum* (Rondani) e 5% para *Melanaphis sorghi* (Theobald). Considerando-se que foram utilizados grupos de 20 afídeos por planta-teste nos ensaios, as probabilidades de transmissão por indivíduo foram estimadas em 0,47, 0,49, 0,16 e 0,26% para *R. maidis*, *R. padi*, *S. graminum* e *M. sorghi*, respectivamente. Embora a eficiência de transmissão por indivíduo tenha sido baixa (<1%), tais resultados

apontam as espécies do gênero *Rhopalosiphum* como as mais eficientes na transmissão de MaYMV, dentre os afídeos testados. Por ser predominante em milho nas principais regiões produtoras de milho do Brasil, *R. maidis* pode ser considerado o vetor mais importante no país. Esse é o primeiro relato de transmissão de MaYMV por espécies de afídeos que não pertencem ao gênero *Rhopalosiphum*, tais como *M. sorghi* e *S. graminum*. Stewart et al. (2020) já havia demonstrado a transmissão desse vírus pelas duas espécies de *Rhopalosiphum*, concluindo que *R. maidis* é mais eficiente que *R. padi*.

Com relação à gama de plantas hospedeiras, estudos recentes indicaram que MaYMV infecta outras gramíneas, tais como cana-de-açúcar, trigo, sorgo (*Sorghum bicolor* L.), capim-camalote (*Rottboellia cochinchinensis* Lour.) e painço (*Panicum miliaceum* L.) (Sun et al., 2021; Guo et al., 2022). O presente estudo mostra que a aveia (*Avena sativa*, L.) também é hospedeira de MaYMV, a partir da transmissão por *R. maidis*.

Os polerovirus apresentam o histórico de infectar não só cereais, mas também hortaliças e frutíferas (Delfosse et al. 2021). Porém, observa-se a identificação do MaYMV até o momento somente em gramíneas, o que pode ser justificado por dois fatores. Esse vírus foi descoberto em milho e os afídeos avaliados como vetores até então são espécies que colonizam gramíneas, sendo em geral oligófagos. O fato de ser transmitido de forma persistente circulativa por afídeos, sem contar com transmissão por semente ou de forma mecânica, também contribui para a limitação de hospedeiros. A localização restrita ao floema e o modo de transmissão persistente circulativa de polerovirus envolvem uma interação mais complexa entre vírus, planta e inseto vetor, resultando em maior especificidade de vetores e, conseqüentemente, em um círculo mais restrito de plantas hospedeiras. Outro fator é que o vírus foi descoberto há poucos anos, sendo os estudos mais voltados para outras gramíneas potencialmente hospedeiras, a fim de entender a epidemiologia em questão e validar estratégias de manejo que pudessem mitigar o avanço da virose de forma eficiente. Com o avanço dos estudos, provavelmente outros grupos taxonômicos de plantas e de afídeos serão investigados como hospedeiras e vetores, respectivamente. Um outro polerovirus que infecta gramíneas, sugarcane yellow leaf virus (ScYLV), também conhecido por vírus do amarelinho da cana-de-açúcar, é transmitido por diferentes gêneros e espécies de afídeos, tais como *Ceratovacuna lanigera* (Zehntner), *Melanaphis sacchari* (Zehntner), *Rhopalosiphum rufiabdominalis* (Sasaki) e *R. maidis* (Bertasello, 2022).

Levantamentos realizados na China em cana-de-açúcar, apontam baixa incidência de MaYMV em plantas com sintomas de mosaico foliar. De 17 locais estudados, apenas três apresentaram amostras de plantas sintomáticas que foram positivas para MaYMV, com

frequências que variaram de 7 a 52% (Sun et al., 2021). Ainda na China, porém analisando-se viroses em cultivo de trigo, a taxa de infecção por MaYV foi de 2% em amostras de plantas sintomáticas de 17 campos diferentes (Gou et al., 2022). Em estudo realizado na África do Sul, relatou-se uma taxa de infecção de MaYMV de 10% em uma amostragem de 485 plantas de milho coletadas em seis províncias (Mamabolo, 2022). Em levantamento realizado em amostras sintomáticas de milho do estado de São Paulo e de outras regiões no Brasil, a taxa de infecção por MaYMV foi de 37% (correspondendo a cerca de 30 plantas); do total positivo para MaYMV, nove plantas ainda apresentavam SCMV e as outras duas apresentavam MSMV ou MRFV. Nenhuma planta foi identificada apenas com infecção simples (Oliveira et al., 2022). A recorrência de infecções mistas serem predominantes se repete para outros estudos como o de Sun et al., (2021). Observa-se alto índice de infecções mistas e essas se destacam para o MaYMV em conjunto com o SCMV (Nithya et al., 2023).

A ampla gama de gramíneas hospedeiras desse vírus impacta diretamente no manejo agrícola. As sucessões de culturas com milho/trigo ou milho/aveia são exemplos de “pontes verdes” que podem gerar não só ambiente propício para a manutenção dos afídeos, assim como garante plantas para manutenção e ampliação de fontes de inóculo do vírus. Apesar da maioria dos relatos pelo mundo ocorrerem inicialmente a partir de plantas de milho, no presente trabalho identificou-se maior taxa de transmissão de MaYMV para as plantas de aveia, que se mostrou assintomática quando infectada pelo vírus.

Apesar do baixo impacto visto até o momento em relação ao MaYMV, esse vírus, assim como os demais transmitidos por afídeos devem receber constante monitoramento, visto que seus vetores se reproduzem por partenogênese telítoca e aos cinco dias as novas ninfas originadas já são consideradas aptas para reprodução (Miranda et al., 2008). Em condições climáticas adequadas e sob um cenário de “ponte verde”, esses insetos podem permanecer no campo causando problemas fitossanitários. O pulgão *Aphis gossypii* (Glover), ainda que não identificado como vetor de MaYMV, é vetor de mais de 50 espécies de vírus e pode colonizar mais de 80 espécies de plantas (Miranda et al., 2008). O afídeo *R. maidis*, dado como principal inseto vetor do MaYMV, apresenta como hospedeiros a cultura do milho, sorgo e outras gramíneas, além de plantas das famílias Cyperaceae e Typhaceae (Nazaret et al., 2012; Pitta e Mendes, 2021). Já o afídeo *R. padi* abrange culturas como trigo, aveia, outras espécies de cereais e pastagens e, além das monocotiledôneas, também é encontrado colonizando dicotiledôneas (Pitta e Mendes, 2021). A ampla gama de hospedeiros para muitas espécies de afídeos garante sua sobrevivência e permanência a campo.

A transmissão, apesar de ser do tipo persistente circulativa e não propagativa, e não infectar a prole diretamente, pode ocorrer de forma bastante efetiva visto que os insetos alados podem percorrer distâncias maiores e infectar novas culturas ou áreas a partir daquela originária contaminada, enquanto os ápteros se encarregam pela transmissão nas plantas adjacentes. A circulação do vírus na hemolinfa do inseto permite que este inocule plantas por alguns dias, até que o vírus se esgote no organismo. Estudos apontam que o cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) pode ser transmitido por até 8 a 12 dias (Miranda et al., 2008), sendo que este é um vírus pertencente ao gênero *Polerovirus*, assim como o MaYMV. O presente estudo apontou que até 5 dias após a aquisição o vetor ainda é capaz de transmitir MaYMV para novas plantas.

Apesar de recentes, estudos já relatam perdas entre 10 e 30% na produção de milho quando as plantas estão infectadas por MaYMV (Bernreiter et al., 2017; Stewart et al., 2020). Dentre as estratégias de manejo utilizadas, pode-se contar com o controle químico e o controle biológico do inseto vetor - muitas vezes natural a campo, sendo baseado em predadores como joaninhas (Coccinellidae) e tesourinhas (Dermaptera). Dentre os produtos químicos, há 42 inseticidas registrados para o controle de *R. maidis* na cultura do milho, tendo como princípios ativos majoritários o acefato (grupo organofosforados) e vários neonicotinóides, tais como dinotefuram, imidacloprido, acetamiprido e clotianidina (Agrofit, 2023). Não há relatos de problemas envolvendo resistência de afídeos a inseticidas em milho, pois esses não são encontrados comumente com alta incidência a campo e, por isso, não são alvos de aplicações frequentes; porém há uma dificuldade a campo de alcance do produto nas colônias formadas em plantas (Pereira et al., 2006). Os neonicotinóides utilizados para outros sugadores acabam servindo de controle para os afídeos também, sendo que acefato e imidacloprido possuem eficiência em torno de 90% no controle (Agrofit, 2023; ITC, 2020; Arnemann, 2021). Sugere-se como um manejo eficaz o uso dos neonicotinóides, os quais, apesar de resultar na hiperexcitação no afídeo antes de causar sua morte (IRAC, 2023), provavelmente, não influencia na transmissão do MaYMV, visto que esse só é transmitido quando o afídeo insere seus estiletes no floema da planta, diferentemente dos vírus de transmissão não persistente, que podem ser adquiridos ou inoculados durante picadas de prova. Além do controle biológico e químico (desde o tratamento de sementes até a pulverização foliar), há também o manejo via tolerância do hospedeiro, consistindo no melhoramento genético para seleção de genótipos tolerantes ao estabelecimento de colônias de afídeos e/ou à multiplicação do vírus (Stempkowski et al., 2022).

Em suma, o presente trabalho gerou informações complementares importantes sobre

as relações de MaYMV com afídeos vetores, plantas hospedeiras e outros vírus, particularmente SCMV. Foi possível constatar a transmissão de MaYMV por afídeos de outros gêneros (*Schizaphis* e *Melanaphis*) além de *Rhopalosiphum*, o qual já havia sido abordado em estudos anteriores. A eficiência de transmissão de MaYMV pelas diferentes espécies de afídeos foi baixa ($\leq 1\%$ de probabilidade e transmissão por indivíduo), mas os dados de tempo de retenção de MaYMV em *R. maidis*, baseando-se nas taxas de transmissão em sucessivos PAIs e nos testes de RT-PCR para detecção do vírus no inseto, permitiram caracterizar a sua transmissão como persistente circulativa. Observou-se que a aveia é mais uma espécie hospedeira para o isolado do vírus estudado, porém não houve infecção em plantas de sorgo, apesar de haver relatos de infecção por Sun et al. (2021), o que pode indicar uma diferenciação genética dos isolados estudados.

Ainda neste estudo, observou-se que MaYMV pode ser transmitido por *R. padi* a partir de plantas-fonte de milho com infecções mistas de sugarcane mosaic virus (SCMV), maize rayado fino virus (MRFV) e maize striate mosaic virus (MSMV), e que a transmissão de MaYMV para milho não é influenciada por uma infecção prévia de SCMV na planta recipiente. Porém, estudos mais aprofundados devem ser realizados para confirmação da hipótese. Finalmente, sugerem-se estudos com novos isolados de MaYMV, em diferentes genótipos de milho e condições ambientais, para verificar se há fatores que possibilitam a expressão de sintomas da virose em milho, já que nas condições do presente estudo não foram observados sintomas aparentes em diferentes genótipos de milho.

6. CONCLUSÕES

- Identificou-se duas novas espécies de insetos vetores do maize yellow mosaic virus (MaYMV) em plantas de milho (*Zea mays* L.), sendo eles *Schizaphis graminum* (Rondani) e *Melanaphis sorghi* (Theobald); além de ser observado a transmissão pelas espécies já abordadas na literatura: *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), *R. padi* (L.);
- A eficiência de transmissão de MaYMV é baixa, com probabilidade de transmissão por indivíduo estimada em cerca de 1%, por dia de acesso à inoculação;
- A espécie *R. maidis* retém MaYMV em seu organismo, bem como a capacidade de transmitir o vírus por pelo menos 5 dias, sem queda na eficiência de transmissão, o que caracteriza a transmissão como persistente circulativa;
- MaYMV pode ser transmitido por *R. maidis* a partir de plantas-fonte de milho com infecções mistas de sugarcane mosaic virus (SCMV), maize rayado fino virus (MRFV) e maize striate mosaic virus (MSMV);
- A transmissão de MaYMV para milho não é influenciada por uma infecção prévia de SCMV na planta recipiente; e
- Identificou-se uma nova espécie de planta hospedeira para o isolado de MaYMV estudado no presente trabalho, a aveia (*Avena sativa* L.);
- O isolado estudado também infecta plantas de milho, mas não sorgo (*Sorghum bicolor* [L.]).

REFERÊNCIAS

- Acompanhamento da safra brasileira (grãos – safra 2022/23). **Companhia Nacional de Abastecimento** (Conab), 2022. Disponível em : < <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4847-producao-nacional-de-graos-e-estimada-em-312-2-milhoes-de-toneladas-na-safra-2022-23>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2023.
- Agência Brasil. **Produção de grãos deve ter alta de 15% na temporada 2022/23**. 2023. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2023-04/producao-de-graos-deve-ter-alta-de-15-na-temporada-202223>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- Agrofit - **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 24 de junho de 2023.
- AMÉRICO, W.F.J.; RIBEIRO, L.P.; CHIARADIA, L.A.; MADALUZ, J.C.; NESI, C.N. Pragas e doenças do milho: diagnose, danos e estratégias de manejo. **Boletim técnico nº 170 – Epagri**. 2016. Disponível em: <<https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/BT/article/view/430>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- ARNEMANN, J. Como funcionam os inseticidas neonicotinoides e espinosinas. **Equipe Mais Soja**. 2021. Disponível em: <https://maissoja.com.br/como-funcionam-os-inseticidas-neonicotinoides-e-espinosinas/>. Acesso em 24 de junho de 2023.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D. SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**, 3ª Ed. New York: John Wiley and Sons Inc, 1997.
- ÁVILA, C.J.; OLIVEIRA, C.M. de; MOREIRA, S.C. da S.; BIANCO, R. TAMAI, M.A. A cigarrinha *Dalbulus maidis* e os enfezamentos do milho no Brasil. **Plantio Direto**, Edição 182 digital. 2021. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/231995/1/37279.pdf>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- BARROS, T.S.L.; DAVIS, R.E.; RESENDE, R.O.; DALLY, E.L. Design of a polimerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. **Plant Disease**, v. 85, p. 475-480, 2001.

- BERNREITER, A.; TEIJEIRO, R.G.; JARRIN, D.; GARRIDO, P.; RAMOS, L. First report of *Maize yellow mosaic virus* infecting maize in Ecuador. **New Disease Reports**, v. 36, p. 11, 2017.
- BERTASELLO, L.E.T. Resistência ao sugarcane yellow leaf virus e ao afídeo vetor *Melanaphis sacchari* em cultivares de cana-de-açúcar e suas interações. **Tese**. Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/9df8084a-4091-471b-bbce-4b7ff0e87756/content>. Acesso em: 27 de dezembro de 2023.
- Brazilian Exports of Soybeans, Soybean Meal and Maize. **Associação Nacional dos Exportadores de Cereais (ANEC) – Statistics**. 2022. Disponível em: <https://anec.com.br/uploads/clchnd75d00bvbjtx779143uj.pdf>. Acesso em 18 de fevereiro de 2023.
- BRUNINI, O.; ROQUE, A.A. de O.; ROMEIRO, J.C.; GOMES, E.C.; SILVA, G.A.; AGUILERA, R.; NOORTWICK, D.; BRUNINI, A.P.C.; CARVALHO, J.P.; ANDRIOSI, M.; YAMAMURA, R.C.M. **Análise das condições hidrometeorológicas no mês de março de 2022 no estado de São Paulo**. 2022. Disponível em: <https://www.cati.sp.gov.br/portal/themes/unify/arquivos/produtos-e-servicos/acervo-tecnico/analise-condicoes-hidrometeorologicas-mar%C3%A7o-2022-SP.pdf>. Acesso em 03 de agosto de 2023.
- BOER, C.A. Resistência constitutiva e induzida por silício em híbridos de milho a *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae). **Tese**. Universidade Federal de Uberlândia. 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/21174/1/Resist%C3%AanciaConstitutivaInduzida.pdf>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- Cabi (Digital Library). *Maize dwarf mosaic virus* (dwarf mosaic of maize). 2021. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompndium.8157>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- Campo em Foco. Vírose e enfezamentos transmitidos pela cigarrinha do milho. **Campo em Foco**. Edição 2. 2020. Disponível em: [https://www.lgsementes.com.br/backend/midias/arquivos/1049.8_edi%C3%A7%C3%A3o_2_campo_em_foco_24nov20\(1\).pdf](https://www.lgsementes.com.br/backend/midias/arquivos/1049.8_edi%C3%A7%C3%A3o_2_campo_em_foco_24nov20(1).pdf). Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- Características dos eventos de milho transgênico. **Crop life Brasil**. 2020. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/publicacoes/caracteristicas-dos-eventos-de-milho-transgenico/>. Acesso em 18 de fevereiro de 2023.

- CASELA, C.R.; FERREIRA, A. da S.; PINTO, N.F. J. de. Doenças na cultura do milho. **Circular técnica 83 – Embrapa**. 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/19627/1/Circ_83.pdf>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- CHEN, S.; JIANG, G; WU, J.; LIU, Y.; WIAN, Y.; ZHOU, X. Characterization of a novel polerovirus infecting maize in China. **Viruses**, v. 8, p. 120, 2016.
- CHEN, W.; SHAKIR, S.; BIGHAM, M.; RICHTER, A.; FEI, Z.; JANDER, G. Genome sequence of the corn leaf aphid (*Rhopalosiphum maidis* Fitch). **GigaScience**, v. 8, p. 1-12, 2019.
- COÊLHO, J.D. Milho: Produção e Mercados. **Caderno Setorial ETENE**. Ano 6, nº 182, 2021. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/910/1/2021_CDS_182.pdf>. Acesso em 03 de agosto de 2023.
- Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). Série Histórica das Safras – Milho. 2023. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/910-Milho>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- Consumo de milho humano e industrial do Brasil em 2022. **Associação Brasileira das Indústrias do Milho (abiMILHO)**, 2022. Disponível em: <<https://www.abimilho.com.br/estatisticas/consumo>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2023.
- CONTINI, E.; MOTA, M.M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R.A.; DA SILVA, A.F.; DA SILVA, D.D.; MACHADO, J.R.A.; COTA, L.V.; DA COSTA, R.V.; MENDES, S.M. Milho – Caracterização e Desafios Tecnológicos. **Série Desafios do Agronegócio Brasileiro (EMBRAPA)**, p. 1-45, 2019.
- COUTINHO, W.B.G. Infestação de *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) em híbridos de milho e incidência de enfezamento e virose. **Instituto Federal Goiano**, Graduação (monografia). 2020. Disponível em: <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/bitstream/prefix/1038/1/TCC_Walter%20Baida%20Garcia%20Coutinho.pdf>. Acesso em 18 de fevereiro de 2023.
- COTA, L.V.; da SILVA, D.D.; AGUIAR, F.M.; da COSTA, R.V. Resistência de genótipos de milho aos enfezamentos. **Circular técnica 247 – Embrapa**. 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/194219/1/circ-247.pdf>>. Acesso em 03 de agosto de 2023.

- CRUZ, I. Avanços e desafios no controle biológico com predadores e parasitoides na cultura do milho. **Milho safrinha XIII Seminário Nacional**, 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/134910/1/Avancos-desafios.pdf>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- CRUZ, I. Controle biológico de pragas do milho – uma oportunidade para os agricultores. 2022. 127p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1143210/control-biologico-de-pragas-do-milho-uma-oportunidade-para-os-agricultores>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- Cultura do milho: melhoramento genético supera os desafios da lavoura. **Crop life Brasil**. 2019. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/cultura-do-milho/>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2023.
- CUNHA, B.A.; NEGREIROS, M.M.; ALVES, K.A.; TORRES, J.P. Influência da época de semeadura na severidade de doenças foliares na produtividade do milho safrinha. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 424-427, 2019.
- COSTA, J.G. da. Caracterização química e genética da interação *Capsicum* spp. (Solanacea), pulgão *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) e o parasitóide *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). **Universidade Federal de Alagoas**. Doutorado (Tese). 140p. 2010.
- DELFOSSÉ, V.C.; BARÓN, M.P.B.; DISTÉFANO, A.J. What we know about poleroviruses: Advances in understanding the functions of polerovirus proteins. **Plant Pathology**, v. 70, p. 1047-1061, 2021.
- DOMINGUES, R.F. Temperatura no potencial de *Aphidius platensis* (BRÈTHES) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE, APHIDIINAE) para o controle biológico de *Melanaphis sorghi* (THEOBALD) (HEMIPTERA: APHIDIDAE). **Universidade Federal de Uberlândia – Instituto de Ciências Agrárias**. Mestrado (Dissertação). 67p. 2022.
- DUARTE, J. O. Mercado do milho. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)**. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho/pre-producao/socioeconomia/mercado>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2023.
- FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O. Transmissão de vírus e controle de viroses em plantas. **Documentos 110**, Embrapa Uva e Vinho, ISSN 1808-4648, março 2019. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195251/1/Doc110.pdf>>. Acesso em 08 de julho de 2023.

- FERREIRA, A. da S.; CASELA, C.R.; FERNANDES, F.T.; PINTO, N.F.J. de A. Doenças causadas por mollicutes e por virus. **Sistemas de Produção 2**, versão eletrônica, 3ª edição, 2007. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69841/1/doencas.pdf>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- FERREIRA, A.D.C.; NERE, D.R.; DA SILVA, L.C.; BLEICHER, E.; BERTINI, C.H.C.M. Screening of cowpea accessions for cowpea aphid resistance. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 50, p. 1-7. 2020.
- FONTENELE, R.S.; ALVES-FREITAS, D.M.T.; SILVA, P.I.T.; FORESTI, J.; SILVA, P.R.; GODINHO, M.T.; VARSANI, A.; RIBEIRO, S.G. Discovery of the first maize-infecting mastrevirus in the Americas using a vector-enabled metagenomics approach. **Archives of Virology**, v. 163, p. 263-267, 2018.
- GALLO, D.; Nakano, O.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Volume 10. Piracicaba: FEALQ, 2002.
- GARCIA-RUIZ, H.; HOLSTE, N.M.; LATOURRETTE K. Poleroviruses (Solemoviridae). **Encyclopedia of Virology**, v. 3 p. 594-602. 2021.
- GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 12.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 467p.
- GONÇALVES MC; MAIA, I. G.; GALLETI, S.R.; FANTIN, G.M. Infecção mista pelo Sugarcane mosaic virus e Maize rayado fino virus provoca danos na cultura do milho no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 348-352, 2007a.
- GONÇALVES, M.C.; SANTOS, A.S.; MAIA, I.G.; CHAGAS, C.M.; HARAKAVA, R. Caracterização de um isolado do *Sugarcane mosaic virus* que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, 32:032-039. 2007b.
- GONÇALVES MC; GALDEANO, D. M.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M. Variabilidade genética de Sugarcane mosaic virus, causando mosaico em milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 46, p. 362-369, 2011.
- GONÇALVES, M.C. Cultura cana-de-açúcar. **Instituto biológico (IB)**. 2016. Disponível em: < http://www.sica.bio.br/guiabiologico/busca_culturas_resultado_ok.php?Id=30&Vlt=3>. Acesso em 18 de fevereiro de 2023.

- GONÇALVES, M.C.; GODINHO, M.; ALVES-FREITAS, D.M.T.; VARSANI, A.; RIBEIRO, S.G. First report of *Maize yellow mosaic virus* infecting maize in Brazil. **Plant disease**, v. 101, p. 2156, 2017.
- GONÇALVES, M.C.; RAMOS, A.; NASCIMENTO, T.; HARAKAVA, R.; DUARTE, A.P.; LOPES, J.R.S. Aphid transmission of *Maize yellow mosaic virus*: an emerging polerovirus. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 544-549, 2020.
- GHOSH, S.; KANAKALA, S.; LEVEDEV, G.; KONTSEDALOV, S.; SILVERMAN, D.; ALON, T.; MOR, N.; SELA, N.; LURIA, N.; DOMBROVSKY, A.; MAWASSI, M.; HAVIV, H.; CZOSNEK, H.; GHANIM, M. Transmission of a new polerovirus infecting pepper by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of Virology*, v. 93, p. 1-14. 2019.
- GRAY, S.; GILDOW, F.E. Luteovirus-Aphid Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 539-566, 2003.
- GUO, M.; YUAN, X.; SONG, Y.; LIU, Y.; WANG, X.F. First report of maize yellow mosaic virus (MaYMV) naturally infecting wheat in China. **Plant Disease**, Disease note, p. 1, 2022.
- HAMMOND, R.W.; KOGEL, R.; RAMIREZ, P. Variability of geographically distinct isolates of maize rayado fino virus in Latin America. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 3153-3159, 1997.
- ICTV – **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/solemoviridae/solemoviridae>. Acesso em: 11 de dezembro de 2023a.
- ICTV – **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/solemoviridae/solemoviridae/polerovirus>. Acesso em: 16 de dezembro de 2023b.
- ITC - INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA COMIGO. **Anuário de Pesquisas Agricultura - Resultados 2020**. Volume 3. Rio Verde, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/H-Nascimento/publication/360365314_ANUARIO_DE_PESQUISAS_AGRICULTURA_-_RESULTADOS_2020/links/62728e16b1ad9f66c8a11a6e/ANUARIO-DE-PESQUISAS-AGRICULTURA-RESULTADOS-2020.pdf#page=84. Acesso em: 24 de junho de 2023.
- IRAC - **Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas**. Disponível em: <https://www.irac-br.org/modo-de-acao>. Acesso em: 27 de dezembro de 2023.

- KLEIN, P.; SMITH, C.M. Host plant selection and virus transmission by *Rhopalosiphum maidis* are conditioned by potyvirus infection in *Sorghum bicolor*. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 14, p. 811-823, 2020.
- KOMADA, K.M.A. Efeitos de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) na seleção de plantas hospedeiras por *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Dissertação**. Universidade de São Paulo. 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-22032019-141536/publico/Karen_Missy_Aki_Komada_versao_revisada.pdf>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- LARANJEIRAS, M. F.A. Comportamento alimentar e crescimento populacional de fitossuccívoros em plantas bt ou submetidas a herbivoria por lagarta. **Tese**. Universidade Federal de Viçosa. 2016. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/26944/1/texto%20completo.pdf>>. Acesso em 03 de agosto de 2023.
- LAU, D.; MAR, T.B.; SILVA, F.N.; FAJARDO, T.V.M.; JUNIOR, A.N.; PEREIRA, F.S.; STEMPKOWSKI, L.A. Barley yellow dwarf virus em trigo no Brasil. **Revisão anual de patologia de plantas**, v. 28, 2022. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/233143/1/Art-Barley-yellow-Lau.pdf>>. Acesso em 08 de julho de 2023.
- LAU, D.; SAMPAIO, M.V.; SALVADORI, J.R.; PEREIRA, P.R.V. da S.; SANTOS, C.D.R. dos; ENGEL, E.; PANIZZI, A.R.; JÚNIOR, A.L.M. Historical and Contemporary Perspectives on the Biological Control of Aphids on Winter Cereals by Parasitoids in South America. **Neotropical Entomology**, v. 52, p. 172-188, 2023.
- LIMA, M.F. Vírus que infectam Plantas. **Embrapa/Hortaliças**. 2013. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/91513/1/VIRUS-QUE-INFECTAM-PLANTAS.pdf>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. Fisiologia da produção de milho. Embrapa, **Circular Técnica**, n. 76, 2006.
- MALISZEWSKI, E. Enfezamentos e viroses avançam no Sul. Agrolink. 2021. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/noticias/enfezamentos-e-viroses-avancam-no-sul_447157.html>. Acesso em 18 de fevereiro de 2023.

- MAMABOLO, Molatela. **Maize yellow mosaic virus detection, distribution, and variation in South Africa**. Faculdade de Ciências, Stellenbosch University, Dissertação, 128 p., 2022.
- MASSAWE, D.P.; STEWART, L.R.; KAMATENESI, J.; ASIIMWE, T.; REDINBAUGH, M.G. Complete sequence and diversity of a maize-associated Polerovirus in East Africa. **Virus genes**, v. 54, p. 432-437, 2018.
- MIRANDA, J.D.; SUASSUNA, N.D.; MORELLO, C. de L.; SILVA, M.V. de F.; FREIRE, E.C. Doença azul do algodoeiro: Novos aspectos a serem considerados no manejo. **Circular técnica 121**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Campina Grande, PB. Julho, 2008.
- MLOTSHWA, S.; KHATARI, N.; TODD, J.; TRAN, H.H.; STEWART, L.R. First report of cDNA clone-launched infection of maize plants with the polerovirus maize yellow mosaic virus (MaYMV). **Virus Research**, v. 295, p. 9, 2021.
- NAZARETH, A.M.; HEBACH, F.C.; MENDES, S.M.; DIAS, A.S.; SANTOS, C.A. dos.; ARAÚJO, O.G.; BARBOSA, T.A.N.; LEITE, N.A.; MARUCCI, R.C. Aspectos biológicos de *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae) em diferentes hospedeiros. **XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo**. 2012.
- NITHYA, K.; VISHNUVARDHAN, J.; BALASARAVANAN, K.; VISHALAKSHI, D.; S.; KAVERINATHAN; VISWANATHAN, R. First report of Maize yellow mosaic virus (MaYMV) infecting sugarcane in India and its molecular characterization. **Australian Plant Pathology**, v. 50, p. 633-638, 2021.
- NITHYA, K.; VISHNUVARDHAN, J.; BALASARAVANAN, S.; KAVERINATHAN, K.; VISHALAKSHI, D.; VISWANATHAN, R. First report of maize yellow mosaic virus (MaYMV) infecting maize in India. **Indian Phytopathology**, v. 76, p. 327-331, 2023.
- OLIVEIRA, A.M.E. de; CARDOSO, L.; ERICSSON, D.B. de C.; XAVIER, M.A. de S.; BICALHO, T.F.; XAVIER, A.R.E. de O. Interação vírus/vetor para pulgões (Hemiptera: *Aphididae*) e mosca-branca (Hemiptera: *Aleyrodidae*). **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 11, p. 1-12, 2019.
- OLIVEIRA, M. da C. S. de; NASCIMENTO, T.; HARAKAVA, R.; DUARTE, A.P.; GONÇALVES, M.C. Levantamento de vírus e mollicutes infectando a cultura do milho no estado de São Paulo e importantes regiões produtoras brasileiras, nos anos de 2021 e 2022. **Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**, 2022. Disponível em: <<https://ciic.iac.sp.gov.br/arquivos/posteres/PO22825.pdf>>. Acesso em: 18 de agosto de 2023.

- PALANGA, E. *et al.* 2017. First report of *Maize yellow mosaic virus* infecting maize in Burkina Faso. **New Disease Reports**, v. 35, p. 26, 2017.
- PANTOJA, K. de F. da C. Identificação de vírus em amendoim forrageiro e pimenta por sequenciamento de nova geração. **Tese**. Universidade Estadual Paulista. 2020. Disponível em:
<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192529/pantoja_kfc_dr_botfca_int.pdf?sequence=4&isAllowed=y>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; TORRES, M.L.G.T.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, v. 31, p. 37-51, 2010.
- PARIZOTO, G.; REBONATTO, A.; SCHONS, J.; LAU, D. Barley yellow dwarf virus-PAV in Brazil: seasonal fluctuation and biological characteristics. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, 2013.
- PEREIRA, P.V. da S.; SALVADORI, J.R.; FIGUEIREDO, A.; FURIATTI, R.S. Ocorrência do pulgão-do-milho *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856): identificação, biologia e danos. **Comunicado técnico 200 – Embrapa**, 2006. Disponível em:
<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/852392/1/pco200.pdf>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- PEREIRA, M.N. Dureza do grão de milho: um tópico brasileiro. **III Simpósio Internacional de Formulação de Dietas Para Gado Leiteiro**. 2014. Disponível em:
<https://dairyfocus.illinois.edu/files/2014_Formuleite.pdf#page=8>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- PITTA, R.M.; MENDES, S.M. XI. Biologia, hospedeiros e manejo de pulgões em milho. **3 décadas de inovações na cultura do milho safrinha: avanços e desafios**. 2021. Disponível em:
<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1139408/1/2021-cpamt-rmp-biologia-hospedeiros-manejo-pulgao-milho.pdf>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2023.
- POZEBON, H. O que você precisa saber sobre o pulgão-do-milho. **Equipe mais soja**. 2022. Disponível em: <<https://maissoja.com.br/o-que-voce-precisa-saber-sobre-o-pulgao-do-milho/>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.

- RIBEIRO, R.S.; WAQUIL, J.M. Linha básica de susceptibilidade do pulgão-verde, *Schizaphis graminum* (Rondani) ao imidacloprid. **26º Congresso Nacional de Milho e Sorgo**. 2006. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/490150/1/Linhabasica.pdf>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- RIBEIRO, L. do P.; CANALE, M.C. Cigarrinha-do-milho e o complexo de enfezamentos em Santa Catarina: panorama, patossistema e estratégias de manejo. **Agropecuária Catarinense**, v. 34, p. 22-25, 2021.
- ROCHA, F. da S.; SALES, N. de L.P.; CATÃO, H.C.R.M. Agentes Fitopatogênicos – Capítulo 10, in livro: **Microbiologia Básica para Ciências Agrárias**. 2011. Disponível em: <https://www.agrointeracao.com.br/downloads/microbiologia_para_ciencias_agrarias.pdf#page=116>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- SABATO, E. de O. Manejo do risco de enfezamentos e da cigarrinha no milho. **Comunicado técnico 226 – Embrapa**. 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/177361/1/ct-226.pdf>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- SALAS, F.J.S.; LOPES, J.R.S.; FERERES, A. Resistência de cultivares de batata a *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 1008-1015, 2010.
- SAMPAIO, M.V.; DOMINGUES, R.F.; MENDES, S.M.; AVELLAR, G.S. *Melanaphis sorghi* (Theobald, 1904) (Hemiptera: Aphididae), an invasive sorghum pest in the American Continent, is a host of *Aphidius platensis* (Brèthes, 1973) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in Brazil. **Entomological Communications**, v. 4, 2022.
- SHAHBANDEH, M. Corn production worldwide 2022/2023, by country. **Statista Agriculture-Farming**. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/254292/global-corn-production-by-country/>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2023.
- SILVA, J.F. da; BLEICHER, E. Resistance of cowpea genotypes to the cowpea black aphid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, 2010.
- SILVA, M.F. da. Resistência de genótipos de cana-de-açúcar ao *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). **Dissertação**. Universidade Estadual Paulista. 2014. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/110323/000794428.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.

- SILVA, R.J.; BUENO, V.H.P.; SAMPAIO, M.V. Qualidade de diferentes espécies de pulgões como hospedeiros do parasitóide *Lisophlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae). **Neotropical Entomology**, v. 37, 2018.
- SMART, C.D.; SCHNEIDER, B.; KIRKPATRICK, B.C. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 2988-2993, 1996.
- SOUZA, I.R.P. de S.; MELLO, N. de O.; CARVALHO, S.G.M.; RODRIGUES, J.A.S.; SABATO, E. de O.; GONÇALVES, I.A.M.; BARROS, B. de A. Potyvirus causando mosaico em plantas daninhas nas culturas do milho e do sorgo. **XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 2016. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/149832/1/Potyvirus-causando.pdf>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- SOUZA, I.R.P. de; BARROS, B. de A.; XAVIER, A. da S.; CARVALHO, S.G.M.; SABATO, E. de O.; GONÇALVES, I.A.M.G.; NODA, R.W.; RODRIGUES, J.A.S. *Johnsongrass mosaic virus* infecting sorghum in Brazil. **International Journal of Current Research**, v. 9, p. 63415-63422, 2017.
- STARY, P.; SAMPAIO, M.V.; BUENO, V.H.P. Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) and their associations related to biological control in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, p. 107-118, 2007.
- STEMPKOWSKI, L.A.; MAR, T.B.; PEREIRA, F.S.; SANTOS, A.K.A.; VALENTE, J.B.; LAU, D.; CASA, R.C.; SILVA, F.N. da. Viroses em trigo no Brasil: Uma visão histórica. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Seção 1. Volume 28, 2022. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1139245/1/RAPP-Viroses.pdf>. Acesso em: 24 de junho de 2023.
- STEWART, L.R.; TODD, J.; WILLIE, K.; MASSAWE, D. KHATRI, N. A. A Recently Discovered Maize Polerovirus Causes Leaf Reddening Symptoms in Several Maize Genotypes and is Transmitted by Both the Corn Leaf Aphid (*Rhopalosiphum maidis*) and the Bird Cherry-Oat Aphid (*Rhopalosiphum padi*). **Plant Disease**, v. 104, p. 1589-1592, 2020.
- STEWART, L.R.; WILLIE, K. Maize yellow mosaic virus interacts with maize chlorotic mottle virus and sugarcane mosaic virus in mixed infections, but does not cause maize lethal necrosis. **Plant Disease**, v. 105, p. 3008-3014, 2021.

- SUN, S.R.; CHEN, J.S.; HE, E.Q.; HUANG, M.T.; FU, H.Y.; LU, J.J.; GAO, S.J. Genetic variability and molecular evolution of maize yellow mosaic virus populations from different geographic origins. **Plant Disease**, v. 105, p. 896-903, 2021.
- SWALLOW, W.H. Group testing for estimating infection rates and probabilities of disease transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 882-889, 1985.
- TANUI, C.; ANAMI, S.; WAMAITHA, J. WANJAIA, B.W. Occurrence of maize yellow mosaic virus and evidence of co-infection with maize lethal necrosis viruses in Bomet County, Kenya. **African Journal of Plant Science**, v. 15, p. 299-308, 2021.
- TORREZ FILHO, J. Identificação de Begomovirus em tomateiro na serra de Ibiapaba, CE e caracterização de um isolado obtido de *Macroptilium lathyroides*. Tese. Universidade Federal do Ceará. 2002. Disponível em: < <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/71762>>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- URU, P.M.S.B. de. Do milho à pamonha. **Monografia**. Universidade de Brasília. 2007. Disponível em: < https://bdm.unb.br/bitstream/10483/207/1/2007_PotiraMorenaSouzaBenkoUru.pdf>. Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- VILANOVA, E.S.; RAMOS, A.; DE OLIVEIRA, M.C.S.; ESTEVES, M.B.; GONÇALVES, M.; LOPES, J.R.S. First report of a mastrevirus (Geminiviridae) transmitted by the corn leafhopper. **Plant Disease**, v. 106, 2022.
- WANG, F.; ZHOU, B.G.; GAO, Z.L.; XU, D.F. A new species of the genus Polerovirus causing symptoms similar to Maize yellow dwarf virus-RMV of maize in China. **Plant Disease**, v. 100, p. 1508, 2016.
- WU, L.; WANG, S.; CHEN, X.; WANG, X. WU, L.; ZU, X.; CHEN, Y. Proteomic and phytohormone analysis of the response of maize (*Zea mays* L.) seedlings to Sugarcane mosaic virus. **Plos One**, v. 8, 2013.
- YAHAIA, A. *et al.* First report of *Maize yellow mosaic virus* infecting sugarcane (*Saccharum* spp.) and Itch Grass (*Rottboellia cochinchinensis*) in Nigeria. **Plant Disease**, v. 101,p. 1335, 2017.
- ZHANG, Y.L.; PENNERMAN, K.K.; WANG, G.; YIN, G. Characterization of a *Sorghum mosaic virus* (SrMV) isolate in China. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 237-242, 2016.