

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

**Fitoplasma do enfezamento-vermelho altera a emissão de voláteis do milho
e o comportamento quimiotático de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott)
(Hemiptera: Cicadellidae)**

Liz Regina Souza Silva

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

**Piracicaba
2022**

Liz Regina Souza Silva
Bacharela em Agronomia

Fitoplasma do enfezamento-vermelho altera a emissão de voláteis do milho e o comportamento quimiotático de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae)

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

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

Piracicaba
2022

Dados internacionais de Catalogação da Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Liz Regina Souza

Fitoplasma do enfezamento-vermelho altera a emissão de voláteis do milho e o comportamento quimiotático de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) / Liz Regina Souza Silva. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

66 p.

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

1. Manipulação vetorial 2. Cigarrinha-do-milho 3. Molicute fitopatogênico 4. Compostos voláteis de plantas I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Regina Célia e Daniel, e a minha querida irmã Daniela Cristina pelo amor, dedicação, incentivo e ajuda

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sabedoria, saúde e perseverança para concluir mais essa etapa da minha vida acadêmica.

Aos meus pais, Regina Célia e Daniel pelo esforço para que eu tivesse a melhor educação possível, e por sempre acreditarem nos meus sonhos.

Ao meu orientador, prof. Dr. José Maurício, pela confiança e incentivo ao longo de todo o processo de execução do trabalho.

A Dra. Maria Cristina Canale, pela colaboração no projeto de dissertação e por toda a disposição em ajudar ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Ao prof. Dr. João Lopes por abrir as portas do Laboratório de Insetos Vetores, para que eu pudesse aprender a criar a cigarrinha-do-milho e realizar os protocolos de detecção molecular do fitoplasma do milho.

A Dra. Arodi Favaris por me ensinar todos os passos da coleta e identificação de voláteis e por me ajudar nos bioensaios comportamentais.

Aos pesquisadores de pós-doutorado, em especial ao Dr. Diego Magalhães, pelo auxílio em todos os procedimentos experimentais e pelas sugestões no processo de escrita da dissertação.

Aos meus colegas do laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos que tornaram essa jornada mais leve, obrigada pela amizade sincera e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Ao MSc. Marvin Pec, além da amizade, agradeço a ajuda nas análises estatísticas e pelas críticas.

Ao Douglas Amado e a Thalita Albuquerque, pela amizade e pelo auxílio com a detecção molecular do fitoplasma do milho.

Ao Euclides Vilanova, pela amizade, sugestões e ensinamentos sobre a criação de *D. maidis* e propagação do fitopatógeno do enfezamento vermelho.

A todos o meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

“Vinde a mim todos que estais cansados e sobrecarregados que eu vos aliviarei. Tomai sobre vós o meu jugo e aprendeis de mim, pois sou manso e humilde de coração, e achareis descanso para as vossas almas. Pois o meu jugo é suave e meu fardo é leve”.

Mateus 11:28-30

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 A CULTURA DO MILHO	11
2.2 CIGARRINHA-DO-MILHO (<i>DALBULUS MAIDIS</i>)	11
2.3 MOLICUTES FITOPATOGÊNICOS	14
2.4 INTERAÇÃO PLANTA-INSETO-PATÓGENO	16
2.5 MANIPULAÇÃO DIRETA E INDIRETA DE INSETOS VETORES	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE <i>D. MAIDIS</i>	23
3.2 TRATAMENTOS.....	25
3.3 BIOENSAIO COMPORTAMENTAL	26
3.4 COLETA E ANÁLISES QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVS).....	27
3.5 PADRÕES SINTÉTICOS	29
3.6 DETECÇÃO MOLECULAR DO FITOPLASMA DO MILHO	29
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4. RESULTADOS	31
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS	31
4.2 COMPOSIÇÃO DO PERFIL DE VOLÁTEIS DOS GENÓTIPOS DE MILHO INFECTADOS E “MOCK”	34
4.3 RESULTADO DA DETECÇÃO MOLECULAR DO FITOPLASMA DO ENFEZAMENTO-VERMELHO DO MILHO	40
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	47

RESUMO

Fitoplasma do enfezamento-vermelho altera a emissão de voláteis do milho e o comportamento quimiotático de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae)

A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae), é responsável pela transmissão de fitopatógenos que causam prejuízos econômicos significativos na cultura do milho, *Zea mays* L. (Poaceae). Dentre eles, o fitoplasma do enfezamento-vermelho pode influenciar o comportamento de insetos-vetores indiretamente, por meio de alterações morfológicas e fisiológica de suas plantas hospedeiras. Este trabalho avaliou o efeito de plantas de milho infectadas ou não com o fitoplasma do enfezamento-vermelho do milho (MBSP) sobre o comportamento de seleção hospedeira de *D. maidis*. Adicionalmente foram identificados os compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por dois genótipos infectados ou não com MBSP. Foram realizados testes de dupla escolha com fêmeas sadias de *D. maidis* em olfatometro Y. Os COVs dos genótipos de milho infectados ou não com MBSP foram coletados em laboratório, identificados e quantificados utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas e cromatógrafo gasoso acoplado a um detector por ionização em chamas, respectivamente. A doença alterou o perfil de voláteis dos dois genótipos testados, tanto quantitativa quanto qualitativamente, induzindo a liberação de seis compostos e aumentando a quantidade liberada de nove compostos no milho híbrido P4285VYHR infectado. Em relação ao comportamento do inseto vetor, a cigarrinha *D. maidis* foi capaz de discriminar entre os tratamentos P4285VYHR infectado e P4285VYHR “mock”, selecionando preferencialmente a planta de milho infectada. No caso do genótipo SCS 156 Colorado, as fêmeas preferiram os odores das plantas “mock” quando contrastados com ar limpo. Dessa forma, *D. maidis* reconhece os voláteis do genótipo híbrido P4285VYHR e responde preferencialmente para aos voláteis emitidos pela planta infectada.

Palavras-chave: Manipulação vetorial, Cigarrinha-do-milho, Molicute fitopatogênico, Compostos voláteis de plantas.

ABSTRACT

Maize bushy stunt phytoplasma changes the emission of maize volatiles and the chemotactic behaviour of *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae)

The corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae), is responsible for the transmission of phytopathogens that cause significant economic losses in maize, *Zea mays* L. (Poaceae). Among them, the maize bushy stunt phytoplasma can indirectly influence the behaviour of insect vectors through morphological and physiological changes in their host plants. This study evaluated the effect of maize bushy stunt phytoplasma (MBSP)-infected and noninfected maize plants on the host selection of *D. maidis*. Additionally, volatile organic compounds (VOCs) emitted by two maize genotypes were identified. Double-choice tests were performed with healthy *D. maidis* females using a Y-tube olfactometer. The VOCs of MBSP-infected and noninfected genotypes were collected in the laboratory, identified and quantified using GC-MS and GC-FID, respectively. The disease altered the volatile profile of the two genotypes, both quantitatively and qualitatively. In P4285VYHR hybrid maize, it induced the release of six compounds and increased the amount of nine others in MBSP-infected plants. *D. maidis* was able to discriminate between MBSP-infected and noninfected P4285VYHR hybrid, preferentially responding to the VOCs emitted by infected plants. In the case of genotype SCS 156 Colorado, females preferred the odors of mock plants when contrasted with clean air. Thus, *D. maidis* recognizes P4285VYHR hybrid VOCs and responds preferentially to infected plants.

Keywords: Vector manipulation, Corn leafhopper; Phytopathogenic mollicute; Plants volatile compounds

1. INTRODUÇÃO

A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae), é considerada uma das principais pragas do milho, *Zea mays* L., por transmitir quatro fitopatógenos que causam doenças importantes nessa cultura: o vírus-da-risca, ‘maize rayado fino virus’ (MRFV), uma espécie-tipo do gênero *Marafivirus* da família Tymoviridae, um segundo vírus agente causal do mosaico estriado do milho (Maize Striate Mosaic Virus; gênero Mastrevirus) (VILANOVA et al., 2022) e duas bactérias da classe Mollicutes, o fitoplasma ‘maize bushy stunt phytoplasma’ (MBSP) e o espiroplasma *Spiroplasma kunkelii*, que são agentes etiológicos dos enfezamentos vermelho e pálido, respectivamente (NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 2013).

Os danos causados pela infecção do fitoplasma do enfezamento-vermelho são provocados pelo envolvimento da expressão de proteínas efetoras, que modificam a fisiologia da planta, ocasionando nanismo, multiespigamento, má formação de espigas, avermelhamento do limbo foliar, redução do potencial produtivo, encurtamento de entrenós e subdesenvolvimento da planta (NAULT, 1980 ORLOVSKIS et al., 2017).

Os enfezamentos do milho já foram considerados doenças secundárias, devido aos surtos e perdas ocasionais (OLIVEIRA et al., 1998). Entretanto, nas últimas safras, tem havido relatos frequentes de perdas na produção em vários estados brasileiros devido a intensificação do sistema de produção e, conseqüente, permanência do inseto-vetor durante todo o ano (GALVÃO et al., 2020). A consolidada safrinha ou segunda safra e a possibilidade de uma terceira safra com sistemas irrigados alteraram o calendário agrícola, resultando em maiores índices de produtividade e, conseqüentemente, maiores lucros (CONAB, 2020). Contudo, esse sistema oferece alimento e abrigo para a cigarrinha durante todo o ano, favorecendo a manutenção do ciclo da praga-vetor e das doenças por ela transmitidas. Além disso, o milho, por vezes, é semeado de forma escalonada em uma mesma propriedade ou em áreas próximas, e como o vetor apresenta uma grande capacidade de dispersão, a existência de plantas em diferentes estádios favorece ainda mais a disseminação desses fitopatógenos (OLIVEIRA et al., 2013, 2015).

As interações entre insetos e plantas são mediadas por pistas olfativas, tácteis, visuais e gustativas, definindo a frequência e a natureza dessas relações, e influenciando o comportamento de seleção hospedeira. Os fitopatógenos, por sua vez, são capazes de induzir mudanças químicas, fisiológicas e morfológicas em seus hospedeiros, podendo indiretamente alterar o comportamento do inseto-vetor, por meio de modificações provocadas na planta

hospedeira, e diretamente devido à aquisição do fitopatógeno, modificando o comportamento de insetos vetores e a consequente aquisição, inoculação e propagação dos fitopatógenos (EIGENBRODE et al., 2002; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, et al., 2004; MEDINA ORTEGA et al., 2009; WERNER, et al., 2009; MAUCK, DE MORAES, MESCHER, 2010; STAFFORD, WALKER, ULLMAN, 2011; MANN et al., 2012).

Alguns trabalhos indicam que fitopatógenos podem induzir a liberação de compostos orgânicos voláteis (COVs) de plantas hospedeiras, de modo a influenciar o padrão comportamental do inseto-vetor, conduzindo-o à aquisição e inoculação. Pistas olfativas liberadas por plantas infectadas com um determinado fitopatógeno podem torná-las mais atraentes e/ou visíveis para os insetos-vetores. Um exemplo de patossistema em que ocorre essa manipulação indireta do vetor é a infecção da macieira, causada por “*Candidatus Phytoplasma mali*” que induz a emissão de β -cariofileno e acaba atraindo o psílideo, *Cacopsylla picta* (Foerster) (syn. *C. costalis*), para plantas infectadas, promovendo sua disseminação (MAYER et al., 2008; SISTERTSON, 2008; AL SUBHI et al., 2021).

Diante do exposto, este trabalho visou estudar o comportamento da cigarrinha-dormilho, *D. maidis*, frente a dois genótipos de milho, nas condições de plantas infectadas e saudas. O intuito foi observar indícios de manipulação indireta do inseto-vetor pelo fitopatógeno causador do enfezamento-vermelho e a existência de COVs induzidos pela doença que poderiam estar associados às alterações do comportamento de seleção hospedeira do inseto-vetor. Especificamente, o estudo se propôs a responder as seguintes questões:

- (i) Existe preferência entre genótipos de milho pela cigarrinha *D. maidis*?
- (ii) Qual o efeito de plantas infectadas ou não com o fitoplasma do enfezamento-vermelho do milho no comportamento de seleção-hospedeira do inseto-vetor?
- (iii) Quais são os COVs emitidos pelos genótipos de milho infectados ou não pelo fitoplasma do enfezamento-vermelho?

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) (Poaceae) está entre as dez principais culturas agrícolas do mundo, sendo um alimento fundamental para a nutrição humana e animal, além de ser utilizado na produção de biocombustíveis (TANUMIHARDJO et al., 2020). Atualmente, é cultivado economicamente na Europa, África, Ásia e América com cerca de 200 milhões de hectares de área plantada e produção anual média de cerca de 1 bilhão de toneladas (FAOSTAT, 2022). A produção é majoritariamente concentrada nos Estados Unidos (358,4 milhões de toneladas), China (260,6 milhões de toneladas) e Brasil (87,0 milhões de toneladas) (USDA, 2022). Já a produção nacional, ocorre predominantemente nos estados do Mato Grosso, Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo (CONAB, 2020a).

Aproximadamente 5 milhões de toneladas de milho são perdidas por safra devido ao ataque de insetos (OLIVEIRA et al., 2014). A cultura do milho é alvo de dezenas de espécies de insetos-praga e sofre ataque desde a semeadura até a colheita dos grãos (WORDELL FILHO et al., 2016). Essas pragas danificam as raízes, o colmo, as folhas e as espigas. Dentre as principais espécies que atacam a cultura do milho no Brasil estão as lagartas *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Helicoverpa zea* (Boddie) e *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), o complexo de percevejos *Euschistus heros* Fabricius, *Dichelops furcatus* (Fabricius) e *Dichelops melacanthus* (Dalla) (Hemiptera: Pentatomidae), e a cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae), por ser um importante vetor de fitopatógenos de plantas.

2.2 Cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*)

O gênero *Dalbulus* é composto por 13 espécies, subdivididas em três grupos monofiléticos, sendo o grupo *maidis* composto por cinco espécies. A cigarrinha-do-milho pertence a subordem Auchenorrhyncha, superfamília Membracoidea, família Cicadellidae, subfamília Deltocephalinae e tribo Macrostelini (TRIPLEHORN & NAULT, 1985). O seu centro de origem é a região do México, especificamente nos altos vales da zona central do país (NAULT, 1983). Esta cigarrinha possui uma íntima associação e coevolução com as espécies do gênero *Tripsacum* L. e teosintos (NAULT, 1983), ancestrais próximos do milho

(WILKES, 1972; DOEBLEY & ILTIS, 1980) que também ocorrem nessa região (NAULT & DELONG, 1980). Ela se adaptou a gramíneas anuais (teosintos) que deram origem ao milho que conhecemos (NAULT, 1983), acompanhando a distribuição e a domesticação da cultura pelas regiões tropicais e subtropicais das Américas (WILKES, 1972), sendo considerada a primeira praga do milho domesticado (NAULT, 1983). Atualmente, é encontrada desde o sul dos EUA até as regiões temperadas da Argentina, e ocorre em todas as regiões do Brasil (TRIPLEHORN & NAULT, 1985; CARLONI et al., 2013; OLIVEIRA, et al., 2013; SANTANA et al., 2019). O primeiro registro no país foi em 1938, quando alguns espécimes foram encontrados em algodoeiros (MENDES, 1938). Ela se alimenta pela sucção contínua de seiva do floema das plantas de milho, sendo vetor de três fitopatógenos de importância agrônômica, dois mollicutes (maize bushy stunt phytoplasma e *Spiroplasma kunkelii*) e um vírus (*Maize rayado fino virus* - MRFV) (NAULT, 1980; NAULT 1990). Os primeiros casos de enfezamentos do milho só começaram a ser relatados em 1971, no estado de São Paulo (COSTA et al., 1971), e 1973, em Pernambuco (COSTA E KITAJIMA, 1973). A partir das décadas de 1980 e 1990, a incidência dos enfezamentos aumentou na região Centro-Sul do país, principalmente, em cultivos tardios (FERNANDES & BALMER, 1990).

A cigarrinha-do-milho é considerada uma espécie estrategista r pelo alto potencial de adaptação, rápido desenvolvimento de ovo a adulto, alta fecundidade e corpo diminuto. Além disso, é possível encontrar de quatro a cinco gerações em uma única safra, com aumentos significativos no número de indivíduos ao longo das gerações (FORCE, 1972; NAULT & MADDEN, 1985; MADDEN et al., 1986; NAULT, 1990; TODD et al., 1991). Seus ovos medem aproximadamente 1,3 mm, são de cor branca e córion transparente. A postura é endofítica, uma vez que as fêmeas depositam os ovos horizontalmente sob a camada epidérmica do limbo foliar ou na nervura central da folha, de forma isolada ou em conjuntos de dois, cinco ou seis ovos. (HEADY & NAULT, 1984; HEADY et al., 1985; MARÍN, 1987). O período embrionário pode durar até oito dias à 26 °C (DAVIS, 1966; MARÍN, 1987; WAQUIL et al., 1999). A espécie passa por cinco estádios ninfais, com duração de 3 a 4 dias cada à 25-30 °C, podendo variar de acordo com o genótipo de milho utilizado (TSAI, 1988; WAQUIL et al., 1999).

Os adultos medem de 3,7 a 4,3 mm de comprimento, possuem coloração amarelo-palha, sendo as fêmeas, normalmente, maiores que os machos. Apresentam duas manchas negras circulares bem evidentes na região da cabeça, que auxilia na sua diferenciação, porém a identificação mais precisa se dá pela observação da genitália masculina e pelo formato do sétimo esternito abdominal da fêmea (TRIPLEHORN & NAULT, 1985; MARÍN, 1987;

OLIVEIRA, 1996). A espécie caracteriza-se ainda por possuir quatro fileiras de espinhos, de tamanhos e densidades diferentes, nas tíbias das pernas posteriores (CAVICHOLI & TAKIYA, 2012). Sua longevidade média varia de 51,4 a 77,5 dias à 26-27 °C, com duração média do ciclo (ovo a adulto) de 26,3 dias (TSAI, 1988; WAQUIL et al., 1999). O período de pré-oviposição é de 8,5 dias e o de oviposição de 29,6 dias aproximadamente (MARÍN, 1987). A fecundidade varia entre 128,7 (23 °C) a 611,1 (27 °C) ovos por fêmea dependendo da temperatura (MARÍN, 1987; TSAI, 1988). As condições de temperatura favoráveis para o seu desenvolvimento são de 25 a 30 °C, porém, ela consegue se desenvolver em temperaturas entre 17,5 e 35 °C (NIEUWENHOVE et al., 2016).

Esta praga está presente na lavoura desde a fase inicial do milho até a sua senescência (TODD et al., 1991), abrigando-se, principalmente, nas folhas mais novas do cartucho. Os adultos são mais ativos que as ninfas e possuem alta mobilidade, alta capacidade de dispersão e migração, comportamentos que permitem sua sobrevivência na entressafra (BRADFUTE et al., 1981; NAULT, 1990; TAYLOR et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2013). Diferente de outras espécies do gênero *Dalbulus*, *D. maidis* não apresenta diapausa, sobrevivendo ao longo do ano conforme a disponibilidade de alimento no campo (ÁVILA & ARCE, 2008; OLIVEIRA et al., 2013, 2015; MENESES, 2015). Mesmo sendo considerada uma praga especialista, a cigarrinha-do-milho pode ser encontrada em outras espécies de plantas (NAULT & DELONG, 1980; TSAI, 1988; NAULT, 1990). No México e na América Central, observou-se que ela consegue se alimentar e reproduzir em plantas do gênero *Trypsacum* e *Zea* (PITRE, 1967, 1970; NAULT & DELONG, 1980; NAULT et al., 1983, 1990; TSAI, 1988). No Brasil, há relatos da ocorrência de posturas em sorgo e milheto, no entanto, a cigarrinha não é capaz de completar o seu ciclo biológico em tais espécies. Os estudos esclarecem que *D. maidis* é capaz de sobreviver por alguns meses em outras espécies de plantas, utilizando-as como abrigo e fonte de alimento temporário, mas não como hospedeiro permanente (TSAI & DELONG, 1989; LARSEN et al., 1992; VIRLA et al., 2003; SUMMERS et al., 2004; MOYA-RAYGOZA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2020).

A estratégia de manejo mais empregada para a redução e controle desse vetor ainda é o controle químico, inicialmente pelo uso de sementes tratadas com inseticidas sistêmicos do grupo dos neonicotinoides (RIBEIRO et al., 2018), a fim de proteger os estágios iniciais da cultura (VE até V2). O passo seguinte é realizar aplicações em pós-emergência, ao atingir o nível de controle (presença do inseto), principalmente no período supercrítico VE-V5 e nos estágios V8-V10, considerado crítico para a infecção das plantas (COTA et al., 2021). A recomendação é que o controle inicial da cigarrinha-do-milho seja associado ao dos

percevejos, realizando duas aplicações sequenciais de inseticidas, com intervalo de 5-7 dias na fase de “milho palito”, e seguir com o monitoramento semanal da lavoura, fazendo aplicações complementares quando necessário (RIBEIRO & CANALE, 2021).

Com relação a disseminação de doenças, tanto as ninfas quanto os adultos são aptos a adquirir os fitopatógenos associados ao complexo de enfezamentos e virose-da-risca, porém, a ninfa é mais eficiente devido ao longo período de latência do microorganismo no interior do inseto, sendo a fase adulta a que mais transmite a doença (NAULT, 1980). Todas as características mencionadas contribuem para a disseminação dos fitopatógenos envolvidos nesse patossistema e sua distribuição está estreitamente relacionada às condições ambientais, principalmente, a temperatura, interferindo tanto na eficiência de transmissão quanto na severidade das doenças (GALVÃO et al., 2020; SABATO et al., 2020).

2.3 Mollicutes fitopatogênicos

Os dois gêneros de fitopatógenos, *Spiroplasma* e “*Candidatus Phytoplasma*”, pertencentes a classe Mollicutes são considerados um problema para mamíferos e plantas por causarem doenças. Ambos são bactérias procariontes, sem parede celular, gram positivas, unicelulares, com tamanho de 1 a 2 µm de diâmetro e genoma relativamente pequeno (530 Kb a 2220 Kb) (ORLOVSKIS et al., 2017). Apresentam ciclo duplo de hospedeiros, uma vez que conseguem se multiplicar em insetos-vetores (cigarrinhas e psílídeos) e em plantas. Apesar de terem surgido da mesma linhagem monofilética, esses fitopatógenos apresentam diferenças. Os espiroplasmas são cultiváveis *in vitro*, possuem formato helicoidal, são móveis e mais associados a insetos do que plantas; já os fitoplasmas, ainda não podem ser cultivados *in vitro*, são pleomórficos, não helicoidais e estão associados a doenças em mais de mil espécies de plantas (CARLE et al., 1995; WILLIAMSON et al., 1997; WILLIAMSON et al., 1998; CHANG, 1998; GASPARICH, 2010).

Os mollicutes são organismos que colonizam os vasos do floema e são transmitidos por meio da alimentação dos insetos-vetores da seiva nutritiva desse tecido. A família Cicadellidae se destaca por possuir a maior parte dos representantes de insetos-vetores de mollicutes fitopatogênicos e a maioria das espécies vetores de fitoplasmas (75%) (FLETCHER, et al., 2006; WEINTRAUB & BEANLAND, 2006). As cigarrinhas do gênero *Dalbulus* são consideradas as únicas espécies conhecidas capazes de transmitir o fitoplasma do enfezamento-vermelho e *S. kunkelii* no país (NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 2013). O modo de transmissão dos mollicutes é do tipo persistente propagativo (WEINTRAUB &

BEANLAND, 2006), pois, ao adquirir o fitopatógeno o inseto passa a transmiti-lo até o fim da vida. É classificado como propagativo uma vez que a bactéria se multiplica no intestino médio do inseto, atinge a hemocele, se multiplica e circula pela hemolinfa e, posteriormente, infecta as glândulas salivares, sendo injetados na planta em mistura com a saliva enquanto o inseto se alimenta no floema (AMMAR et al., 2004; GASPARICH, 2010; AMMAR et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2016). A temperatura e o estágio do vetor influenciam na eficiência de transmissão, assim como o título bacteriano na planta que aumenta com o tempo (WEI et al., 2004; SABATO et al., 2020).

A transmissão é dividida em três etapas, a saber: a primeira é o período de acesso à aquisição (PAA) em que o vetor adquire o fitopatógeno ao se alimentar de plantas infectadas (fonte de inóculo); a segunda etapa corresponde ao período entre o início do PAA e o inseto estar apto a transmitir o fitopatógeno, sendo chamado de período de latência (PL); e por fim, o período de acesso a inoculação (PAI) é o tempo necessário para que o inseto inocule o fitopatógeno em uma nova planta. A duração de cada uma dessas etapas varia de acordo com o patossistema. Para adquirir e inocular a planta com o fitoplasma do enfezamento-vermelho e *S. kunkelii*, *D. maidis* precisa de uma a duas horas e um período de latência entre 19 e 24 dias (NAULT, 1980; MOYA-RAYGOZA & NAULT, 1998; WEINTRAUB & BEANLAND, 2006).

Somente três espécies de espiroplasmas causam doenças em plantas: *Spiroplasma citri*, *S. kunkelii* e *S. phoeniceum*, associadas a doenças em citros, milho e vinca, respectivamente. Os fitoplasmas, por sua vez, são todos fitopatogênicos possuindo grande diversidade de hospedeiros (MARKHAM et al., 1974; NAULT, 1980; SAILLARD et al., 1987; GASPARICH, 2010). A infecção por fitoplasma desencadeia diversas mudanças bioquímicas na planta, além de afetar a homeostase de seus nutrientes. Para driblar as estratégias de defesa da planta, essas bactérias secretam as proteínas de virulência do fitoplasma (efetores) (TORUÑO et al., 2016), capazes de modificar as vias fisiológicas da planta, levando a diferentes alterações. As proteínas efetoras de fitoplasmas, como SAP11 e SAP54, induzem a proliferação de ramos e perflios e revertem flores em folhas, modificações que se assemelham aos sintomas de vassoura-de-bruxa e filodia, respectivamente (MACLEAN et al., 2011). O TENGU, outro efetor, induz nanismo, proliferação de brotos no caule e esterilidade, provavelmente, por meio da inviabilização das vias de sinalização de auxina e ácido jasmônico (MINATO et al., 2014; ORLOVSKIS et al., 2015; IWABUCHI et al., 2019). Um análogo ao SAP11 produzido pelo fitoplasma do enfezamento-vermelho induz brotações axilares e evita o desenvolvimento de inflorescências no milho (PECHER et al., 2019). Outro

efetor, polimorfismo de uma lipoproteína de fase variável, e uma proteína de exportação de lipoproteína ABC dependente de ATP, desencadeiam uma série de sintomas, tais como: ramificação lateral, proliferação de espigas, atrofia de plantas, deformação, necrose, amarelecimento e avermelhamento de folhas (ORLOVSKIS et al., 2017). Os sintomas induzidos pelos fitoplasmas podem ser considerados uma estratégia evolutiva desses fitopatógenos para manipulação do inseto-vetor, favorecendo sua disseminação (SUGIO & HOGENHOUT, 2012; TOMKINS et al., 2018). Os danos provocados pela cigarrinha-do-milho através sucção de seiva e injeção de toxinas são negligenciáveis, na maioria das vezes, sendo relevantes apenas em situações pontuais quando ocorre altas infestações da praga (BUSHING & BURTON, 1974; WAQUIL, 1997). No entanto, a transmissão do fitoplasma do enfezamento-vermelho provoca a redução do porte da planta e da área foliar, encurtamento de entrenós, multiespigamento, redução da altura de inserção da espiga, má formação de espigas e grãos, o que acaba prejudicando a produtividade (VILANOVA, 2021). Além desses sintomas, observa-se um avermelhamento das margens e do ápice das folhas seguido de seca (NAULT, 1980; ORLOVSKIS et al., 2017).

2.4 Interação planta-inseto-patógeno

O sistema atual de produção brasileira de milho conta com duas ou até três safras por ano. Esse cultivo intensivo teve início na década de 1980 com a chamada safrinha (segunda safra), que acabou sendo inserida no calendário agrícola. Inicialmente, a safrinha era considerada apenas uma alternativa, mas com a expansão da produção, ela passou a ser fortemente praticada, se tornando uma fonte de renda indispensável para o produtor (SABATO, 2017; COELHO et al., 2017). Na safra de 2019/20, 74,4% da área e 73% da produção de milho advinham da safrinha (CONAB 2020b). Esse tipo de sistema produtivo permite o estabelecimento de pontes verdes no campo, favorecendo a permanência de pragas e fitopatógenos ao longo do tempo, em decorrência do aumento da área plantada e da ampliação da janela de semeadura (OLIVEIRA et al., 2002b, 2015). Os surtos populacionais da cigarrinha-do-milho e os prejuízos que as doenças transmitidas por ela vêm causando nos últimos anos estão fortemente relacionados com a constante oferta de plantas, proporcionada pelo tipo de cultivo frequentemente adotado (OLIVEIRA & FRIZZAS, 2022).

Os enfezamentos são doenças sistêmicas e vasculares que afetam a fisiologia e a nutrição das plantas de milho levando a perdas que ultrapassam 70% da produção de grãos (OLIVEIRA et al., 2002a; SABATO, 2017). Um fator que aumenta a incidência dessas

doenças no campo é a presença de plantas em diferentes estádios vegetativos associado à alta capacidade de dispersão do inseto, o que acaba por favorecer a disseminação dos fitopatógenos nas áreas de cultivo (OLIVEIRA et al., 2013). A oferta ininterrupta de alimento no campo e o escalonamento das janelas de plantio favorecem a manutenção do nível populacional de *D. maidis* elevado, bem como de inóculos das doenças, o que possibilita o aumento das taxas de infectividade e incidência dos enfezamentos. É importante ressaltar que as perdas causadas pelos enfezamentos variam de acordo com o grau de tolerância dos genótipos de milho utilizados (CASTILHOS et al., 2022). Desta forma, quanto mais tarde a semeadura da safrinha é realizada, maiores as chances de incidência e perdas causadas por essas doenças (OLIVEIRA et al., 2002b, 2003).

A cigarrinha-do-milho possui alta performance de dispersão e migração, geralmente, saindo de cultivos em senescência para áreas mais novas, por preferir a fase inicial do milho, comportamento que deve ser considerado no manejo desta praga (TAYLOR et al., 1993; WAQUIL et al., 1999). O patossistema do complexo dos enfezamentos demanda a implementação de um manejo integrado regionalizado com a colaboração ativa dos produtores na adoção de medidas para reduzir o inóculo e a sobrevivência de cigarrinhas infectivas, o que, conseqüentemente, diminuiria os surtos das doenças transmitidas pelo vetor (MATTHEWS et al., 2003). Recomenda-se ainda realizar a colheita do milho de forma correta para diminuir o resto de grãos no campo; a eliminação de plantas voluntárias de milho na entressafra; realizar a semeadura respeitando o zoneamento agroclimático da cultura; evitar o plantio sucessivo de milho e plantios tardios, assim como a semeadura em áreas próximas a lavouras com enfezamentos; diversificar e rotacionar as variedades e híbridos de milho utilizados, dando preferência para os que possuem maior tolerância aos enfezamentos; evitar o cultivo nas proximidades de plantas que podem ser usadas como abrigo (sorgo, trigo e braquiária) pelo inseto-vetor; rotacionar o mecanismo de ação dos inseticidas utilizados, a fim de retardar a evolução da resistência de populações no campo; e, sempre que possível, inserir produtos biológicos à base de fungos entomopatogênicos no manejo, por exemplo, *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) e *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) (RIBEIRO & CANALE, 2021; COTA et al., 2021).

2.5 Manipulação direta e indireta de insetos vetores

Os fitopatógenos transmitidos por vetores são capazes de alterar as características fenotípicas de seus hospedeiros, modificando as interações hospedeiro-vetor de forma

vantajosa para a sua transmissão e disseminação no ambiente (ROY & RAGUSO, 1997; EBBERT & NAULT, 2001; EIGENBRODE et al., 2002; HURD, 2003; MARIS et al., 2004; BELLIURE et al., 2005; LEFÉVRE et al., 2006; LEFÉVRE & THOMAS, 2008; MAUCK, DE MORAES & MESCHER, 2010; BOSQUE-PÉREZ & EIGENBRODE, 2011). Os compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados pelas plantas são os principais e mais prováveis alvos de manipulação, podendo influenciar o comportamento do vetor que, por vezes, é atraído para a planta infectada, visto que os insetos também fazem uso de pistas olfativas para encontrar alimento e abrigo (MCLEOD et al., 2005; MAUCK, DE MORAES & MESCHER, 2010; BOSQUE-PÉREZ & EIGENBRODE, 2011).

A dinâmica de dispersão de fitopatógenos transmitidos por vetores necessita que os insetos entrem em contato com plantas infectadas, possibilitando a aquisição desse organismo e, posteriormente, interaja com plantas não infectadas para que a inoculação aconteça. Os fitopatógenos podem influenciar esse processo por meio de efeitos na planta ou no vetor, modificando a frequência e a natureza de suas interações. A infecção é capaz de alterar as pistas produzidas pelo hospedeiro e a qualidade de seus recursos, como parte da estratégia de manipulação indireta do comportamento do vetor ou apenas como subproduto da infecção. Existe ainda a possibilidade de o fitopatógeno causar efeitos diretos no comportamento de seleção hospedeira do vetor, uma vez que eles podem colonizar e persistir no organismo do inseto por longos períodos após a aquisição (MAUCK et al., 2012; MAUCK, MESCHER & DE MORAES, 2016).

Existem debates a respeito das alterações que os fitopatógenos causam em seus hospedeiros, pois elas podem ser consideradas apenas um subproduto da infecção que, conseqüentemente, beneficia o parasita e não de fato uma manipulação intencional. No entanto, parece ser um consenso entre os estudiosos que a seleção natural favorece os efeitos patológicos da infecção tendo influência positiva na transmissão e dispersão dos fitopatógenos (POULIN & THOMAS, 1999; THOMAS, ADAMO & MOORE, 2005). Portanto, é de se esperar que a maioria das mudanças fenotípicas de uma planta hospedeira induzida por um fitopatógeno resulte em efeitos positivos ou neutros em relação a transmissão de doenças pelo vetor.

A hipótese de manipulação vetorial explica a evolução das estratégias utilizadas por fitopatógenos, que otimizam sua disseminação por meio dos efeitos diretos e indiretos sobre os vetores (INGWELL et al., 2012). Desse modo, um vírus fitopatogênico é capaz de influenciar diretamente o comportamento de seleção hospedeira de seu vetor, a fim de aumentar a sua própria disseminação, visto que o inseto não infectado é atraído por plantas

hospedeiras infectadas pelo vírus e, quando adquirem o fitopatógeno, seu comportamento é modificado, passando a preferir plantas não infectadas. As infecções por vírus e outros fitopatógenos alteram a química das plantas hospedeiras, modificando o comportamento do vetor indiretamente, ou seja, por meio da planta. Vários estudos corroboram a hipótese de manipulação vetorial (EIGENBRODE et al., 2002; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, et al., 2004; MEDINA ORTEGA et al., 2009; WERNER, et al., 2009; MAUCK, DE MORAES, MESCHER, 2010; STAFFORD, WALKER, ULLMAN, 2011; MANN et al., 2012). As mudanças que o fitopatógeno provoca na planta hospedeira estão diretamente relacionadas com seu modo de transmissão e a duração e/ou extensão de sua associação com o vetor envolvido no patossistema em questão. Alguns fitopatógenos circulam e se propagam dentro de seus vetores por longos períodos, denominados persistentes. Em contrapartida existem fitopatógenos que se associam rapidamente com seus vetores, os chamados não-persistentes. As particularidades das relações patógeno-vetor ditam as alterações que os fitopatógenos terão sobre o comportamento de seu respectivo vetor, apresentando efeitos indiretos distintos mediados pelas plantas hospedeiras, visto que a disseminação eficiente necessita de diferentes comportamentos do vetor de acordo com o patossistema. Portanto, existe um padrão consistente de que o modo de transmissão molda o efeito do fitopatógeno sobre o vetor, podendo manipulá-lo direta ou indiretamente (MAUCK, DE MORAES & MESCHER, 2010; MAUCK et al., 2012).

Em um estudo feito por Mauck e colaboradores (2010), documentando os efeitos do vírus *Cucumber mosaic virus* (CMV) na qualidade e atratividade da planta hospedeira *Curcubita pepo* cv. Dixie para os vetores *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*, constataram que o CMV reduz a qualidade da planta infectada e ao mesmo tempo a torna mais atraente pela indução de compostos voláteis semelhantes àqueles emitidos por plantas saudáveis. Nesse modelo de manipulação indireta, o vírus promove um aumento na atração dos vetores que logo se dispersam devido à baixa qualidade da planta, realizando um padrão de comportamento altamente benéfico para seu modo de transmissão não-persistente, que não requer a alimentação sustentada do inseto na planta. Em um patossistema em que o modo de transmissão é persistente, como no caso do fitoplasma do enfezamento vermelho, o fitopatógeno tende a aumentar a atração do inseto-vetor para o hospedeiro infectado melhorando sua qualidade a fim de promover a alimentação sustentada pelo tempo necessário para aquisição do fitopatógeno possibilitando então a sua disseminação, evidenciando novamente a existência de uma manipulação indireta do vetor pelo fitopatógeno (MAUCK et al., 2012).

Outros estudos mostram que vírus fitopatogênicos podem modificar as características fenotípicas de seus hospedeiros, como pistas químicas e visuais, o que conseqüentemente manipula os padrões de retenção, alimentação, reprodução e dispersão do vetor (ECKEL & LAMPERT, 1996; EIGENBRODE et al., 2002; JIMENEZ-MARTINEZ et al., 2004; BELLIURE et al., 2005; FERERES & MORENO, 2009). Mauck e colaboradores (2010) sugeriram em seus estudos que a manipulação de vetores necessita de íntima coevolução hospedeiro-patógeno-vetor, sendo eficiente somente em associações muito específicas.

Alguns dos exemplos mais consolidados da manipulação indireta de vetores são as modificações da emissão de voláteis induzidas por dois vírus de plantas: o vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll vírus*) (Luteoviridae: Polerovirus) e o vírus do nanismo amarelo da cevada (*Barley yellow dwarf luteovirus*), em que os pulgões foram mais atraídos pelos odores de plantas infectadas quando comparado com plantas não infectadas (EIGENBRODE et al., 2002; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ et al., 2004; SRINIVASAN et al., 2006; NGUMBI et al., 2007). Oluwafemi e colaboradores (2011) investigaram as respostas comportamentais de *Cicadulina storeyi* China (Hemiptera: Cicadellidae), um importante vetor do vírus da estria do milho, *Maize streak virus* (Geminiviridae: gênero *Mastrevirus*), agente causal de uma doença que impacta negativamente essa cultura na África Subsaariana (THOTTAPPILLY et al., 1993). Nesse estudo foi observado o comportamento de *C. storeyi* a COVs liberados por mudas de milho plantas infestadas ou não por essa cigarrinha, mas nesse caso não foi avaliado o efeito de plantas infectadas com a doença da estria do milho. Os bioensaios de olfatométrica, em que as cigarrinhas tiveram contato com os voláteis emitidos diretamente da planta, mostraram que *C. storeyi* respondeu preferencialmente aos voláteis de plântulas de milho não infestadas quando comparado com plântulas infestadas. Em outros testes de dupla escolha, comparando somente as amostras coletadas de COVs de plantas infestadas vs. não infestada e/ou vs. solvente, a cigarrinha também foi atraída pelos COVs de plantas não infestadas. Curiosamente, os COVs de plantas infestadas não foram preferidos, uma vez que os insetos preferiram o solvente quando confrontado com os COVs de plantas infestadas. Após a identificação dos compostos induzidos pela infestação de *C. storeyi*, novos testes foram feitos com os compostos sintéticos Salicilato de metila, (*E*)-cariofileno, (*E*)- β -farneseno e TMTT (semioquímicos voláteis envolvidos na defesa de plantas contra outros insetos sugadores) e todos os repeliram *C. storeyi*, que respondeu preferencialmente ao solvente. Por fim, quando esses compostos sintéticos foram adicionados aos COVs brutos de plântulas de milho não infestadas (mistura atraente), o comportamento do inseto mudou. A adição de salicilato de metila, (*E*)- β -farneseno ou TMTT mascarou a atratividade da mistura

bruta, tornando-a repelente para *C. storeyi*. Já a adição de (*E*)- β -cariofileno não alterou a preferência do inseto aos COVs de plantas não infestadas.

Em um trabalho recente, Ramos e colaboradores (2020) investigaram as mudanças no comportamento de seleção hospedeira de *D. maidis*, realizando testes de dupla escolha, em que os insetos entravam em contato com plantas inoculadas e falsamente inoculadas com o fitoplasma do enfezamento-vermelho, em estado sintomático e assintomático da doença. Machos e fêmeas sadias de *D. maidis* não foram capazes de diferenciar folhas infectadas assintomáticas de folhas sadias, enquanto as fêmeas infectadas apresentaram preferência por folhas sadias, comportamento que permite a inoculação do fitopatógeno e a disseminação primária da doença nos estádios iniciais do desenvolvimento da lavoura. Na fase sintomática da doença, machos e fêmeas sadias preferiram pousar em folhas infectadas, possibilitando a aquisição do fitopatógeno, e algumas horas depois as fêmeas se movimentaram para folhas sem sintomas, mudança comportamental que favorece a disseminação secundária da doença. Este trabalho deixa evidente que o fitopatógeno consegue otimizar sua disseminação no ambiente por meio da manipulação indireta do comportamento de seleção hospedeira do inseto vetor.

Já Gonzalez e colaboradores (2018) avaliaram o efeito do período de pós-inoculação do fitoplasma do enfezamento-vermelho na preferência de plantas de milho e na eficiência de transmissão de *D. maidis*. A preferência foi mensurada pelo estabelecimento do inseto e pela oviposição em plantas de milho sadias vs. infectadas apresentando sintomas iniciais, avançados e assintomáticas. A cigarrinha-do-milho preferiu se estabelecer ou ovipositar em plantas sadias ou em plantas infectadas com sintomas iniciais da doença. No entanto, ao oferecer plantas de milho infectadas com sintomas avançados da doença, o vetor mostrou clara preferência por plantas sadias. Quando oferecido plantas infectadas assintomáticas, a cigarrinha-do-milho preferiu as plantas com os maiores períodos de pós-inoculação (9 a 13 dias) ao invés de plantas sadias. Isso evidencia que esse vetor prefere plantas de milho sadias ou que aparentam estar sadias, ou seja, em estágios iniciais da doença. O estudo também mostrou que a eficiência de transmissão da doença é semelhante tanto para insetos que adquiriram o fitopatógeno de plantas fonte assintomáticas com 14 dias de pós-inoculação quanto para os que adquiririam o fitoplasma de plantas infectadas assintomáticas com 20 e 27 dias de pós-inoculação.

As diferentes escolhas de *D. maidis* entre plantas infectadas ou não com o fitoplasma do enfezamento-vermelho nos estágios sintomáticos e assintomáticos da doença, provavelmente, estão associadas às mudanças fisiológicas e morfológicas das plantas causadas pela infecção

que conseqüentemente altera as pistas visuais, tácteis e os COVs da planta hospedeira (MAYER et al., 2008ab; MAZZONI et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação e manutenção da colônia de *D. maidis*

Uma colônia de *D. maidis* livre do fitoplasma foi estabelecida a partir da coleta de espécimes em plantações de milho em Jardinópolis, SP, Brasil, e mantida no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos (ESALQ/USP). Os insetos foram criados em gaiolas (50 × 30 × 30 cm) em condições controladas (26,0 ± 1,0 °C e fotofase de 12 h) (Figura 1). Em cada gaiola, foram colocadas 21 plantas de milho híbrido LP2019, com 4-5 folhas totalmente expandidas, para a alimentação e oviposição das cigarrinhas. A substituição das plantas debilitadas devido à alimentação dos insetos foi realizada três vezes por semana. A cada dez dias, plantas de milho livres do fitopatógeno eram oferecidas a adultos sadios por 48-72 h para a realização de posturas. Após esse período, tais plantas eram colocadas em novas gaiolas para perpetuação da colônia (OLIVEIRA et al., 2017).



Figura 1. Gaiolas utilizadas para manter a colônia de *Dalbulus maidis* em plantas de milho livre do fitoplasma do enfezamento-vermelho em ambiente controlado.

O isolado R4 do fitoplasma do enfezamento-vermelho, utilizado nos experimentos para a produção de plantas e insetos infectados, foi obtido a partir de plantas com sintomas típicos da doença do enfezamento-vermelho, coletadas em campo de produção de milho em Piracicaba, SP (ORLOVSKIS et al., 2017). A fim de perpetuar o isolado e estabelecer uma colônia infectiva, aproximadamente 800 ninfas de terceiro instar da criação livre do fitopatógeno foram confinadas em gaiolas contendo duas plantas de milho infectadas com o isolado R4 (fonte de inóculo) e com sintomas evidentes do enfezamento-vermelho (45 a 55

dias após a inoculação) (GONZALES, JARAMILLO & LOPES, 2018). O período de acesso a aquisição (PAA) da doença foi de 4 dias (Figura 2 A). Após o PAA, as plantas fontes foram descartadas e plantas livre do fitopatógeno foram ofertadas durante o período de latência (PL) dos insetos (25 dias), sendo substituídas uma vez por semana, a fim de evitar a eclosão de novas ninfas (OLIVEIRA et al., 2017).

Para a produção de plantas fonte do inóculo, 10 insetos infectados com o fitoplasma do enfezamento-vermelho (que foram previamente submetidos ao PAA e PL) foram confinados em plantas saudas (com duas folhas totalmente expandidas) durante um período de acesso a inoculação (PAI) de 4 dias (Figura 2 B). Após o PAI, as plantas foram mantidas em gaiolas feitas com armação de ferro e protegidas com tecido *voil* (80 × 50 × 100 cm) alocadas na estufa (Figura 2 C) sob condições naturais de temperatura e luminosidade. As ninfas recém eclodidas foram descartadas com o auxílio de um sugador e, posteriormente, as futuras plantas fonte de inóculo foram retiradas das gaiolas e mantidas na estufa (OLIVEIRA et al., 2017). Esses procedimentos foram estabelecidos de forma cíclica para a produção de insetos e plantas infectadas.

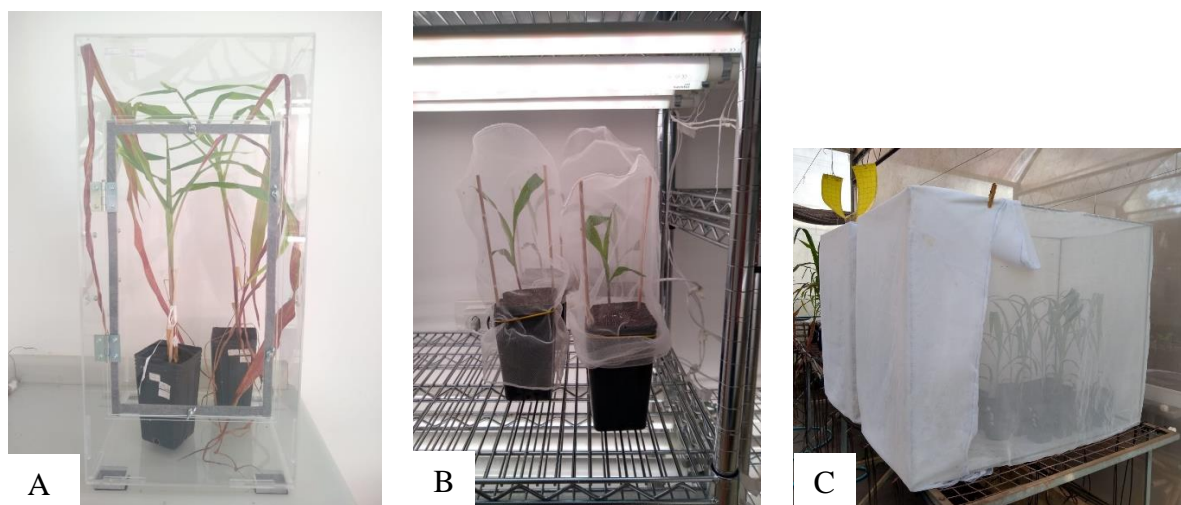


Figura 2. A. Gaiola contendo plantas de milho como fonte de inóculo com sintomas evidentes do fitoplasma do enfezamento-vermelho, na qual ninfas de 3^o instar de *Dalbulus maidis* foram confinadas para a aquisição do fitopatógeno. B. Insetos infectivos com o fitoplasma do enfezamento-vermelho confinados em plantas de milho saudas do híbrido LP2019 durante o período de acesso a inoculação (PAI) para produção de plantas fonte de inóculo. C. Plantas mantidas em gaiolas na estufa após a inoculação. As ninfas que eclodiam eram regularmente descartadas para evitar proliferação indesejável dos insetos sobre as plantas a serem utilizadas nos bioensaios.

3.2 Tratamentos

As sementes dos genótipos de milho SCS156 Colorado e P4285VYHR foram cedidas pelo Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Cepaf/Epagri, Chapecó, SC, Brasil). As plantas utilizadas nos experimentos foram cultivadas em potes de plástico de 0,8 L com substrato comercial Basaplant, fertirrigadas de duas a três vezes por semana com macro e micronutrientes e mantidas em estufa sob temperatura e umidade ambiente de 22,5 °C e 70 %, respectivamente (Piracicaba, SP, Brasil).

As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: P4285VYHR infectado (Hi), P4285VYHR “mock” (Hm), SCS156 Colorado infectado (Ci) e SCS156 Colorado “mock” (Cm). As plantas infectadas com o fitoplasma do enfezamento-vermelho foram obtidas a partir de um PAI de 48 h, confinando 20 insetos adultos infectivos por planta (com uma folha totalmente expandida) em gaiolas de *voil* (Figura 3) (RAMOS et al., 2020). Durante o PAI, as plantas permaneceram em sala com condições controladas, a $26,0 \pm 1,0$ °C e fotofase de 12 horas, sob luz artificial. Após a inoculação, os insetos foram retirados com auxílio de um sugador e as plantas acondicionadas em uma outra gaiola feita com armação de ferro e protegida com tecido *voil* (80 × 50 × 100 cm), mantida em estufa até a eclosão das ninfas, que foram removidas com sugador e descartadas diariamente (Figura 2 C).

As plantas sadias denominadas “mock” foram falsamente inoculadas da mesma forma que as plantas infectadas, porém utilizando insetos adultos livres do fitopatógeno. É importante ressaltar que após a inoculação, as plantas verdadeiramente inoculadas ficavam em uma gaiola diferente das falsamente inoculadas, para evitar contaminação entre os tratamentos.

As plantas infectadas e “mock” foram utilizadas nos bioensaios 15 dias após a inoculação (V5-V6) uma vez que a eficiência de transmissão do fitoplasma do enfezamento-vermelho por insetos que adquiriram o fitopatógeno a partir de plantas fonte de milho assintomáticas com 14 dias após a inoculação, é de 93% (Gonzalez et al., 2017). Após os experimentos, as plantas infectadas (assintomáticas) foram mantidas em estufa até o surgimento dos sintomas do fitoplasma do enfezamento-vermelho para a confirmação da infecção (45 a 55 dias após a inoculação) (RAMOS et al., 2020).



Figura 3. Gaiolas de *voil* usadas para confinar adultos de *Dalbulus maidis* nos genótipos de milho (SCS156 Colorado e P4285VYHR) para produzir plantas infectadas, se infectivos com o fitoplasma do enfezamento-vermelho, e “mock”, se oriundos da criação e sem serem submetidos a aquisição do fitoplasma do enfezamento-vermelho.

3.3 Bioensaio comportamental

Fêmeas de *D. maidis*, com 10 a 30 dias de idade, provenientes da colônia livre do fitoplasma do enfezamento-vermelho foram usadas em testes de olfatômetro em Y (diâmetro interno de 1,5 cm e braços laterais e principal com 18,5 e 23,5 cm, respectivamente). Os bioensaios foram conduzidos utilizando fêmeas, por considerar que elas desempenham um papel importante na transmissão desse fitopatógeno uma vez que são menos ativas e passam mais tempo se alimentando (HEADY & NAULT 1985, HUNT & NAULT, 1991; OLIVEIRA et al., 2004c), comportamento esse que facilita a infecção de plantas próximas (CANALE et al., 2018). Além disso, um estudo feito por Ramos e colaboradores (2020) observou que fêmeas sadias preferiram se assentar em plantas com sintomas do fitoplasma do enfezamento-vermelho do milho e posteriormente se movimentaram para plantas sadias, o que pode favorecer a disseminação do MBSP.

Os bioensaios foram realizados em uma sala com as mesmas condições da criação estoque, entre as 10:00 e 17:00 h. O olfatômetro foi colocado sob luz artificial uniforme e conectado a um sistema ARS Volatile Collection System (Gainesville, FL, EUA) com filtros de carvão, umidificadores e medidores de vazão. O ar limpo foi empurrado pelo sistema através de mangueiras de politetrafluoroetileno (PTFE) para dois sacos de poliéster (45 cm de largura e 70 cm de comprimento) (Wyda ®, Sorocaba, SP, Brasil), cada um contendo uma única planta de milho ou ar limpo (saco vazio). O fluxo de ar foi ajustado para 0,3 L/min/braço. Os sacos foram conectados aos braços laterais do olfatômetro por meio de

mangueiras sanfonadas de PTFE (Figura 4). O substrato e o vaso contendo as plantas foi coberto com papel alumínio antes do início dos testes para evitar odores provenientes destas fontes. O olfâmetro foi posicionado verticalmente e as cigarrinhas introduzidas individualmente no braço principal. Cada inseto foi usado apenas uma vez. O olfâmetro foi trocado a cada cinco insetos testados, e o lado da fonte de odor foi invertido a cada réplica. As plantas foram substituídas a cada cinco respostas. Considerou-se uma resposta quando o inseto ultrapassava os primeiros 5 cm de um dos braços laterais e não voltava para o centro do olfâmetro. O tempo de observação para se obter cada resposta foi de no máximo 10 min. Caso o inseto não respondesse durante esse período e tivesse cruzado os 10 cm iniciais do braço principal, ele era considerado não responsivo. As combinações testadas no olfâmetro foram: Hm vs. ar limpo, Hi vs. ar limpo, Hi vs. Hm, Cm vs. ar limpo, Ci vs. ar limpo, Ci vs. Cm, Cm vs. Hm e Ci vs. Hi. Para cada combinação, foram testados pelo menos 30 insetos (n=30) a fim de se obter no mínimo 30 respostas por combinação.

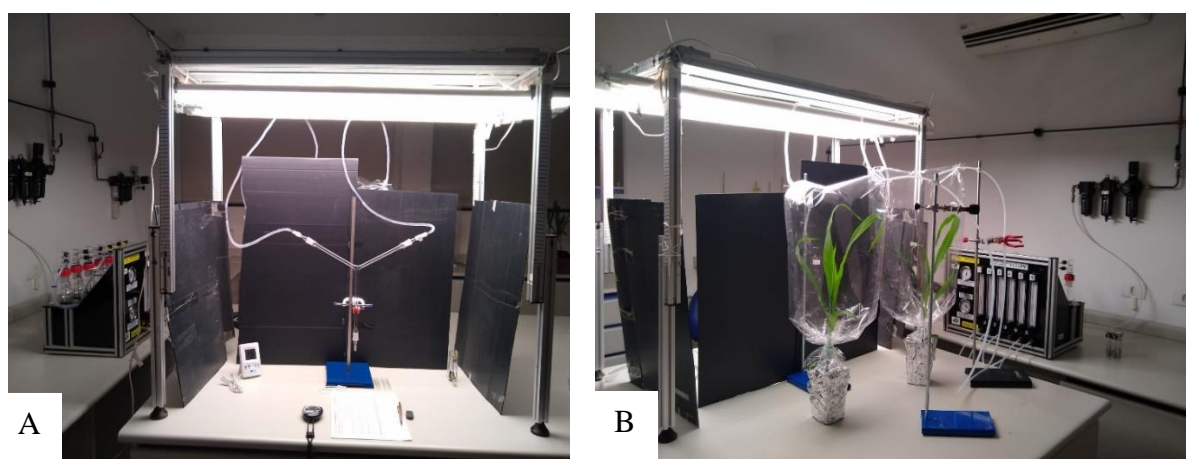


Figura 4. Sistema de olfatometria utilizado nos bioensaios com *Dalbulus maidis* e diferentes genótipos de milho infectados ou não com o fitoplasma do enfezamento-vermelho. A. Visão frontal do sistema, destacando o olfâmetro isolado de pistas visuais. B. Visão traseira com as plantas de milho (fonte de odor).

3.4 Coleta e análises químicas dos compostos orgânicos voláteis (COVs)

A coleta dos COVs foi adaptada de Sanches et al. (2017), sendo realizada em condições de laboratório (temperatura de $25,0 \pm 1,0$ °C, e fotofase de 12 h) por meio da aeração de plantas de milho sob luz artificial emitindo ~ 120 a $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR. As plantas foram acondicionadas individualmente em cubas de vidro (38 cm de comprimento e 20,5 cm de diâmetro), conectadas via mangueira de PTFE ao sistema ARS Volatile Collection System. Um fluxo de ar purificado e umidificado a 2,0 L/min entrava constantemente na cuba.

Na conexão de saída do ar, foi acoplada uma coluna de vidro contendo 30 mg do polímero adsorvente Hayesep Q® (malha 80/100; Supelco, Bellefonte, PA, EUA) para a coleta dos voláteis. Uma bomba de vácuo foi conectada ao tubo adsorvente para sucção do ar através do polímero a 1,0 L/min. A coleta foi realizada por 8 h (9:00-17:00 h) (Figura 5). Após a coleta, os voláteis foram eluídos do polímero utilizando 300 µl de hexano destilado, coletados em vial âmbar de 2 mL e armazenados a -30 °C até sua utilização. Foram feitas coletas de voláteis dos dois genótipos, P4285VYHR e SCS156 Colorado (estádio V5-V6), em situação infectada e “mock” (Hm, Hi, Cm e Ci), com 7 repetições cada.

As amostras foram concentradas para 50 µl sob fluxo suave de N₂ e, posteriormente, adicionaram-se 10 µl de acetato de nonila a 10 ppm (padrão interno). Para as análises quantitativas, utilizou-se um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector por ionização em chamas (GC-FID; GC-2010, Shimadzu Corp., Quioto, Japão). O GC foi equipado com uma coluna apolar (30 m × 25 µm × 25 mm; Rtx-1; RESTEK, Bellefonte, PA, EUA), sendo o hélio empregado como gás de arraste a 1,3 mL/min, com velocidade linear de 30,3 cm/s, e pressão de topo da coluna a 98,4 kPa. Uma alíquota de 2 µl de cada amostra foi injetada em modo *splitless* a 250 °C, com forno ajustado a 40 °C iniciais por 5 min, aumentando 5 °C/min até atingir 150 °C por 1 min e, finalmente, aumentando 20 °C/min até atingir 250 °C, onde permaneceu por 30 min. A quantificação dos compostos foi baseada nas áreas dos picos em relação à área do pico do padrão interno.

Para a identificação dos compostos, 2 µl de amostras selecionadas foram injetados em um GC acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS; GC-2010QP Ultra, Shimadzu Corp.) equipado com uma coluna de fase estacionária não polar (30 m × 25 µm × 25 mm; Rxi-1MS, RESTEK). O GC-MS foi ajustado com as mesmas condições de temperatura do programa de injeção e forno usadas na análise por GC-FID. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram ajustadas em 250 °C, com uma faixa de massas escaneadas de 35 - 700 m/z. O hélio foi usado como gás de arraste a 1,3 mL/min com uma velocidade linear de 41,0 cm/s. Uma solução de alcanos (C7 - C30; Sigma-Aldrich) também foi injetada para o cálculo do índice de retenção (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963). Nos cromatogramas, os picos foram integrados usando o software GCMS Solution (versão 4.20), e os compostos foram identificados com base nos índices de retenção (IR), espectros de massa por comparação com bibliotecas NIST e injeção de padrões sintéticos quando disponíveis.



Figura 5. Sistema utilizado para a coleta dos compostos orgânicos voláteis dos genótipos de milho, por meio de cubas de vidro conectadas ao sistema ARS Volatile Collection System.

3.5 Padrões sintéticos

Para confirmar e comparar o IR e espectro de massas dos compostos candidatos identificados pela biblioteca NIST, foram injetados no GC-MS (ajustado nas mesmas condições descritas anteriormente) os padrões sintéticos: (*Z*)-3-hexen-1-ol ($\geq 98\%$), α -pineno (98%), octanal (99%), β -mirceno (90%), (*Z*)-3-acetato de hexenila (98%), α -felandreno ($\geq 85\%$), ocimeno ($\geq 90\%$), limoneno (96%), γ -terpineno (97%), benzoato de metila (99%), linalol ($\geq 95\%$), 2-bornanona ($\geq 97\%$), salicilato de metila ($\geq 98\%$), eugenol (99%), farneseno (mistura de isômeros) e eucaliptol (99%) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); e os compostos DMNT e TMTT que foram sintetizados a partir do geraniol e (*E,E*)-farnesol, respectivamente, por oxidação de seus aldeídos correspondentes, seguida por metilenação de Wittig (LEOPOLD, 1990).

3.6 Detecção molecular do fitoplasma do milho

Para a identificação de plantas infectadas com o fitoplasma, o DNA total de amostras foliares das plantas utilizadas nos bioensaios comportamentais e na coleta de voláteis foi extraído pelo método à base de Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB), conforme protocolo adaptado de Doyle & Doyle (1987). As amostras foliares foram maceradas com o auxílio de um almofariz e pistilo de porcelana e 0,5 g do tecido vegetal de cada amostra foram pesados em balança analítica. As amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 ml e

foram adicionados 800 μL de solução tampão (2x CTAB) e 1,6 μL de β -mercaptoetanol. As amostras foram homogeneizadas por inversão por 2 min e incubadas à 60 °C por 30 min, sendo homogeneizadas novamente em agitador tipo vórtex a cada 10 min. Após a incubação, foram adicionados 600 μL de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico, 24:1) em cada amostra, as quais foram novamente homogeneizadas por inversão por 2 min e centrifugadas (12.000 rpm) por 10 min à 25 °C. O sobrenadante (500 μL) de cada amostra foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, e adicionado igual volume de isopropanol (-20 °C). As amostras foram homogeneizadas por inversão durante 2 min e incubadas *overnight* no freezer para precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm) por 20 min a 20°C e o sobrenadante foi descartado, mantendo apenas o *pellet*. O processo de lavagem do *pellet* foi realizado duas vezes com 1 mL de etanol a 80% e deixado em repouso por 5 min a cada lavagem. Posteriormente, foram adicionados 500 μL de NaCl em cada amostra, as quais foram homogeneizadas no vórtex e incubadas por 30 min a 4 °C. As amostras foram centrifugadas (12.000 rpm) por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante (450 μL) foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionado o mesmo volume de isopropanol. Em seguida, foram homogeneizadas novamente por inversão (2 min) e incubadas por 15 min em ultra freezer (-80 °C). Uma nova centrifugação foi feita (12.000 rpm) por 10 min a 4 °C e depois adicionou-se 600 μL de etanol 80% e as amostras foram incubadas por 10 min. O etanol foi descartado preservando o *pellet* precipitado, que foi seco em estufa a 40 °C por 20 min e, por fim, o *pellet* foi diluído em 100 μL de solução tampão TE.

O mix da reação padrão de PCR ficou estabelecido para um volume final de 25 μL com os seguintes reagentes e concentrações finais: 10 mM Tris-Cl + 50 mM KCl (PCR buffer 10x, Sinapse); 1,5 mM MgCl_2 ; 0,2 mM dNTP (Sinapse); 0,5 pM para cada iniciador; 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen [5 U/ μL]); 17,55 μL de água ultrapura e 1 μL do DNA template (1 ng/ μL). Foram utilizados os iniciadores P1 (5' AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT'3) forward e AYint (5' TACAATTTGCAAGCAAGTTAC'3) reverse, desenhados a partir da região 16s rDNA do fitoplasma (SMART et al., 1996), amplificando um inserto de 1.500 nucleotídeos. Cada ensaio realizado no termociclador era composto por uma amostra de controle positivo (DNA de plantas infectadas com o fitoplasma do enfezamento-vermelho já identificados por PCR), além das amostras das plantas de interesse. A reação de amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial por dois minutos a 94 °C; 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, a 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 2 min respectivamente, finalizando a reação com uma etapa de extensão adicional a 72 °C

por 5 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se marcador de massa molecular de 1000 pb (DNA Ladder 1000 bp – Invitrogen). A observação e documentação da eletroforese foram realizadas em fotodocumentador com coloração das amostras via Dye (SYBR® Green I - ThermoFisher).

3.7 Análise estatística

A resposta de *D. maidis* nos bioensaios de olfatometria foi analisada aplicando-se Modelos Lineares Generalizados (GLM - Generalized Linear Models) com distribuição binomial. O teste log-likelihood ratio foi utilizado para comparar as fontes de odor. A qualidade do ajuste foi determinada através de um gráfico semi-normal com um envelope de simulação.

A normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (Bartlett) dos COVs liberados pelas plantas de milho foram testados e como não apresentaram normalidade nem homogeneidade, foram utilizados GLM com distribuição Gama e/ou Gaussiana inversa, conforme a necessidade de cada caso. As comparações foram feitas utilizando a função “emmeans” e os p-valores corrigidos por Bonferroni. A qualidade dos modelos foi determinada através de um gráfico semi-normal com um envelope de simulação.

As análises foram feitas no ambiente R 4.0.3 (R Core Team, 2019) utilizando os pacotes lme4 (BATES et al., 2015), emmeans (SEARLE, SPEED, & MILLIKEN, 1980) e hnp (MORAL, HINDE & DEMÉTRIO, 2017).

4. RESULTADOS

4.1 Testes comportamentais

As fêmeas de *D. maidis* não discriminaram os odores das plantas dos tratamentos P4285VYHR “mock” (Hm) e P4285VYHR infectado (Hi) quando contrastados com ar limpo (GLM: χ^2 0,2668, gl = 1, P = 0,6054; GLM: χ^2 0,2668, gl = 1, P = 0,6054, respectivamente) (Figura 6 A). No entanto, os insetos preferiram os voláteis das plantas Hi quando confrontados com Hm (GLM: χ^2 4,6810, gl = 1, P = 0,0305) (Figura 6 A). Ao comparar SCS156 Colorado infectado (Ci) com ar limpo e SCS156 Colorado “mock” (Cm), não houve preferência significativa pelo inseto-vetor (GLM: χ^2 1,4335, gl = 1, P = 0,2312; GLM: χ^2 1,0698, gl = 1, P = 0,3010, respectivamente) (Figura 6 B). Porém, as fêmeas preferiram os odores das plantas Cm quando contrastados com ar limpo (GLM: χ^2 9,8739, gl = 1, P =

0,0016) (Figura 6 B). Ao comparar os tratamentos entre os genótipos, Cm vs. Hm e Ci vs. Hi, o inseto não apresentou preferência em nenhuma das duas situações (GLM: χ^2 1,0698, gl = 1, $P = 0,3010$; GLM: χ^2 0,0571, gl = 1, $P = 0,8111$) (Figura 6 C).

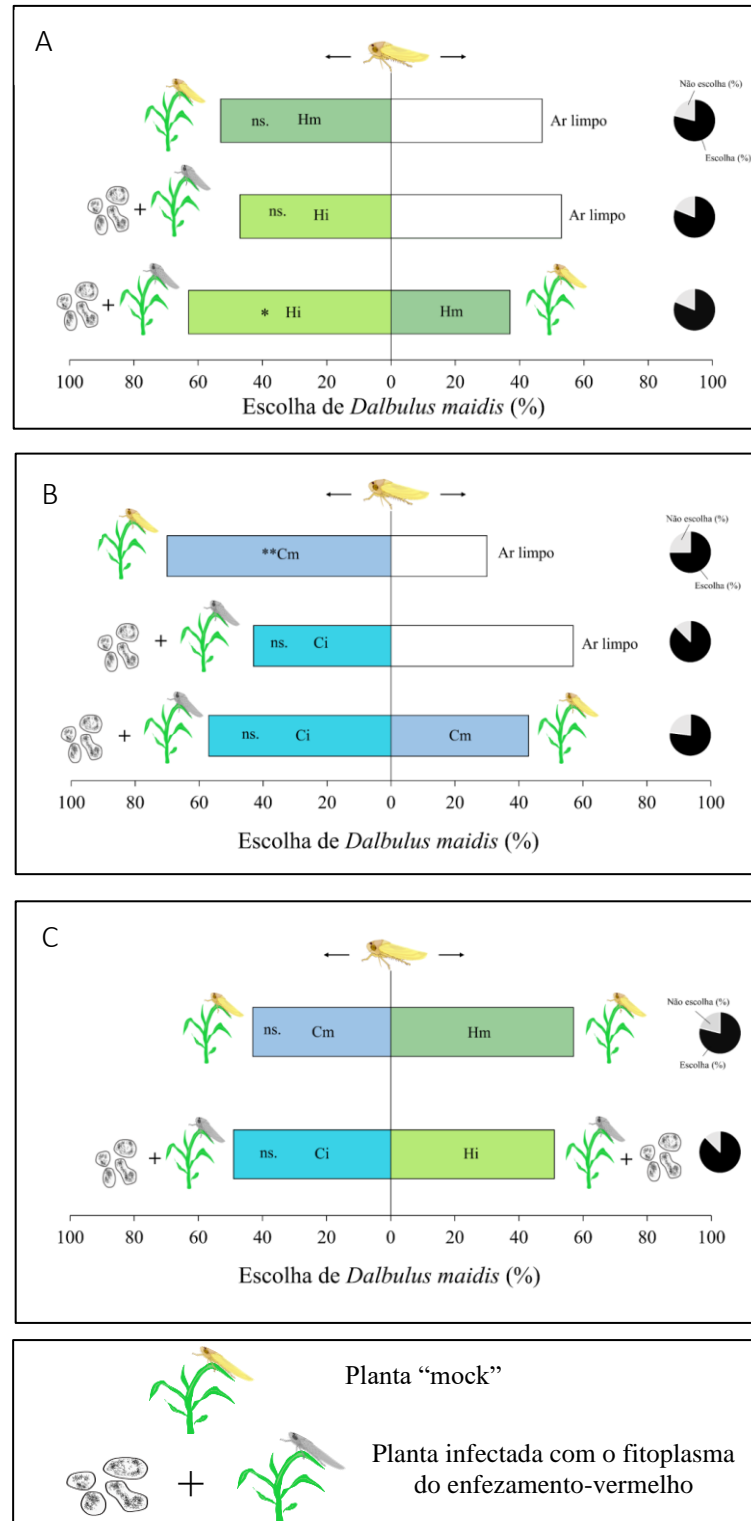


Figura 6. Resposta olfativa de fêmeas sadias de *Dalbulus maidis* aos compostos orgânicos voláteis de genótipos de milho infectados ou não pelo fitoplasma do enfezamento-vermelho. A. Resposta aos odores do genótipo P4285VYHR. B. Resposta aos odores do genótipo SCS156 Colorado. C. Resposta ao contraste dos odores dos dois genótipos. Não escolha indica a porcentagem de indivíduos testados que não fizeram nenhuma escolha. Asterisco indica diferença significativa entre as fontes de odor, onde: * $0,05 > P > 0,01$ e ** $0,01 > P > 0,001$. ns.: não significativo. P4285VYHR infectado (Hi), P4285VYHR "mock" (Hm), SCS156 Colorado infectado (Ci) e SCS156 Colorado "mock" (Cm).

4.2 Composição do perfil de voláteis dos genótipos de milho infectados e “mock”

Ao comparar as plantas falsamente inoculadas (“mock”) com as plantas infectadas, observou-se que o perfil de voláteis mudou, tanto quantitativamente quanto qualitativamente. Foram identificados 34 compostos, dos quais 16 são comuns a todos os quatro tratamentos (Tabela 1). A produção média de voláteis totais diferiu entre os tratamentos, aumentando de forma significativa nas plantas infectadas em relação às plantas “mock” de seus respectivos genótipos (P4285VYHR: GLM, χ^2 9,1259 gl = 1, $P = 0,00252$; SCS156 Colorado: GLM, χ^2 6,1628 gl = 1, $P = 0,0130$) (Tabela 2). Tal separação é claramente observada nos gráficos gerados pela PCA (Figura 7).

No genótipo P4285VYHR, a infecção induziu a emissão de eucaliptol, β -guaïeno indol, α -muroleno, octanal e TMTT; aumentou significativamente a liberação de ciclosativeno DMNT, *cis*- β -farneseno, α -guaïeno, linalol, β -mirceno, *cis*- β -ocimeno, ylangeno e β -ylangeno (Tabela 1); e suprimiu a liberação de D-limoneno. A primeira e a segunda componentes da PCA explicaram 71,4 % da variabilidade dos dados para os tratamentos P4285VYHR infectado e “mock”. Os seguintes compostos estão mais correlacionados com o tratamento P4285VYHR infectado: DMNT, eucaliptol, eugenol, α -guaïeno, β -guaïeno, indol, linalol, β -mirceno, α -muroleno, *cis*- β -ocimeno, octanal, salicilato de metila e TMTT; enquanto os compostos *trans*-2-decenol, D-limoneno e sulcatona estão mais correlacionados com P4285VYHR “mock” (Figura 7 A).

O genótipo SCS156 Colorado também teve seu perfil de voláteis alterado pela infecção, induzindo a emissão de α -acetato de terpineol, *trans*- β -ocimeno e octanal; e aumentando de forma significativa a liberação de benzoato de metila e linalol (Tabela 1). Nesse caso, a primeira e a segunda componentes da PCA explicaram 53% da variabilidade dos dados. Os compostos que mais se correlacionaram com o tratamento SCS156 Colorado infectado foram: (3*E*) -acetato de hexenila, α -acetato de terpineol, benzoato de metila, (+) 2-bornanone, indol, linalol, β -mirceno, *cis*- β -ocimeno, *trans*- β -ocimeno, octanal, e salicilato de metila. Já para o tratamento SCS156 Colorado “mock”, foram os compostos DMNT, α -felandreno, α -guaïeno, metileugenol e sulcatona (Figura 7 B).

Em relação às classes químicas, no genótipo P4285VYHR a doença induziu a emissão de aldeídos e aromáticos e aumentou a liberação de monoterpenos, homoterpenos e sesquiterpenos. No genótipo SCS156 Colorado, a doença também induziu a emissão de aldeídos e aumentou a liberação de monoterpenos (Tabela 2). Ao comparar todos os tratamentos entre si (independente do genótipo), observou-se que a quantidade média de

voláteis totais e homoterpenos produzida por Hm foi menor (Figura 8 A e G, respectivamente), e Hi liberou uma maior quantidade de voláteis de folhas verdes (Figura 8 B) em relação a Ci e Cm. Por sua vez, Ci teve uma maior emissão de monoterpenos, aldeídos, ésteres e aromáticos que Hi (Figura 8 C, E, F e I, respectivamente).

Tabela 1. Quantidade média (\pm SE) de compostos orgânicos voláteis emitidos (ng/8 h) por genótipos de milho infectados ou não pelo fitoplasma do enfezamento-vermelho.

N°	Compostos	IR*	Hi	Hm	P	Ci	Cm	P
1	(Z)-3-Hexen-1-ol	848	1,73 \pm 0,39	1,19 \pm 0,36	0,326			
2	α -Pineno	932				7,07 \pm 1,04	5,51 \pm 0,96	0,282
3	Sulcatona	968	8,89 \pm 1,06	11,37 \pm 0,68	0,065	7,66 \pm 1,77	7,56 \pm 1,34	0,964
4	Octanal	980	1,52 \pm 0,25			3,35 \pm 0,38		
5	β -Mirceno	984	56,39 \pm 8,57	33,47 \pm 4,28	0,009	55,57 \pm 9,91	24,87 \pm 12,28	0,201
6	(3E)-Acetato de hexenila	991	10,73 \pm 4,54	6,48 \pm 1,56	0,302	3,79 \pm 0,58	2,31 \pm 0,59	0,098
7	α -Felandreno	995				2,46 \pm 0,66	2,00 \pm 0,26	0,489
8	o-Cimeno	1011				12,69 \pm 1,70	12,02 \pm 1,56	0,77
9	Eucaliptol	1018	16,65 \pm 2,64					
10	D-Limoneno	1020	8,77 \pm 0,73	14,86 \pm 1,88	< 0,001	16,96 \pm 3,89	12,25 \pm 1,96	0,244
11	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1029				4,24 \pm 0,89		
12	<i>cis</i> - β -Ocimeno	1040	7,23 \pm 1,49	2,57 \pm 0,43	< 0,001	30,73 \pm 9,30	22,77 \pm 9,46	0,56
13	γ -Terpineno	1049				4,37 \pm 0,87	3,89 \pm 0,96	0,714
14	Benzoato de metila	1069				11,66 \pm 6,46	2,20 \pm 0,19	0,005
15	Linalol	1085	553,30 \pm 105,08	278,43 \pm 45,10	0,006	1187,53 \pm 294,44	294,05 \pm 77,88	< 0,001
16	DMNT	1106	166,73 \pm 74,94	28,58 \pm 7,29	0,001	101,83 \pm 30,54	72,71 \pm 15,89	0,365
17	(+)-2-Bornanona	1119	7,89 \pm 1,36	6,29 \pm 0,87	0,303	5,04 \pm 0,70	4,79 \pm 0,94	0,83
18	Citronelol	1151				4,76 \pm 1,03	6,33 \pm 1,78	0,42
19	Terpinen-4-ol	1161				4,21 \pm 0,52	3,90 \pm 0,86	0,763
20	Salicilato de metila	1168	37,39 \pm 7,10	22,78 \pm 5,76	0,119	185,98 \pm 93,78	102,96 \pm 41,44	0,363
21	<i>trans</i> -2-Decenol	1185	37,70 \pm 6,47	42,95 \pm 5,11	0,532			
22	Indol	1256	31,90 \pm 9,69			118,04 \pm 43,09	47,02 \pm 19,37	0,1
23	Eugenol	1330	10,11 \pm 1,77	6,06 \pm 1,18	0,051	11,94 \pm 2,34	8,00 \pm 1,90	0,195
24	α -Acetato de terpineol	1332				3,43 \pm 2,58		
25	Ciclosativeno	1368	202,01 \pm 50,58	98,78 \pm 15,77	0,017	55,07 \pm 45,14	158,42 \pm 35,54	0,224
26	Ylangeno	1370	93,28 \pm 23,09	46,91 \pm 8,11	0,024	27,38 \pm 18,45	81,67 \pm 18,48	0,133
27	Metileugenol	1372	19,81 \pm 5,65	10,91 \pm 4,97	0,270		8,20 \pm 4,30	
28	β -Ylangeno	1415	65,69 \pm 13,60	37,18 \pm 5,44	0,026	35,33 \pm 16,85	79,36 \pm 14,05	0,117
29	<i>cis</i> - β -Farneseno	1449	20,33 \pm 3,60	11,21 \pm 2,33	0,031	31,88 \pm 6,14	28,61 \pm 5,13	0,682
30	α -Guaiano	1477	44,28 \pm 15,84	15,11 \pm 2,59	0,008	15,36 \pm 7,29	59,71 \pm 25,98	0,073
31	α -Muroleno	1495	14,90 \pm 2,79					
32	δ -Cadineno	1518	26,26 \pm 6,88	13,69 \pm 3,01	0,059	17,95 \pm 6,15	28,68 \pm 8,52	0,304
33	β -Guaiano	1528	2,61 \pm 0,73					
34	TMTT	1572	7,72 \pm 2,88			23,43 \pm 7,39	25,98 \pm 10,47	0,839

*Índice de retenção

Valores de P em negrito indicam diferença significativa entre os tratamentos analisados por GLM com distribuição Gama ou Gaussiana inversa e teste Tukey.

P4285VYHR infectado (Hi), P4285VYHR “mock” (Hm), SCS156 Colorado infectado (Ci) e SCS156 Colorado “mock” (Cm).

Tabela 2. Quantidade média (\pm SE) de voláteis emitidos (ng/8 h) por genótipos de milho infectados ou não pelo fitoplasma do enfezamento-vermelho de acordo com o grupo químico.

Classe química	Hi	Hm	<i>P</i>	Ci	Cm	<i>P</i>
Voláteis de folhas verdes	12,46 \pm 4,70	7,66 \pm 1,46	0,253	3,79 \pm 0,58	2,31 \pm 0,59	0,098
Monoterpeno	660,34 \pm 116,68	341,67 \pm 51,06	0,005	1355,24 \pm 309,12	404,25 \pm 86,74	< 0,001
Cetona	8,89 \pm 1,06	11,37 \pm 0,68	0,065	7,66 \pm 1,77	7,56 \pm 1,34	0,964
Aldeído	1,52 \pm 0,25			3,35 \pm 0,38		
Éster	37,39 \pm 7,10	22,78 \pm 5,76	0,119	197,65 \pm 99,97	105,16 \pm 41,47	0,329
Homoterpeno	174,45 \pm 77,74	28,58 \pm 7,29	0,001	125,26 \pm 33,98	98,69 \pm 24,42	0,517
Álcool	37,70 \pm 6,47	42,95 \pm 5,11	0,532			
Aromático	31,90 \pm 9,69			118,04 \pm 43,09	47,02 \pm 19,37	0,100
Sesquiterpeno	469,36 \pm 111,64	222,87 \pm 36,21	0,011	182,97 \pm 91,05	436,45 \pm 93,85	0,114
Fenilpropanoide	19,81 \pm 5,65	10,91 \pm 4,97	0,270		8,20 \pm 4,30	
Voláteis totais	1453,80 \pm 289,02	688,79 \pm 98,02	0,003	1989,75 \pm 382,09	1105,78 \pm 149,74	0,013

*Valores de *P* em negrito indicam diferença significativa entre os tratamentos analisados por GLM com distribuição Gama ou Gaussiana inversa e teste Tukey.

P4285VYHR infectado (Hi), P4285VYHR “mock” (Hm), SCS156 Colorado infectado (Ci) e SCS156 Colorado “mock” (Cm)

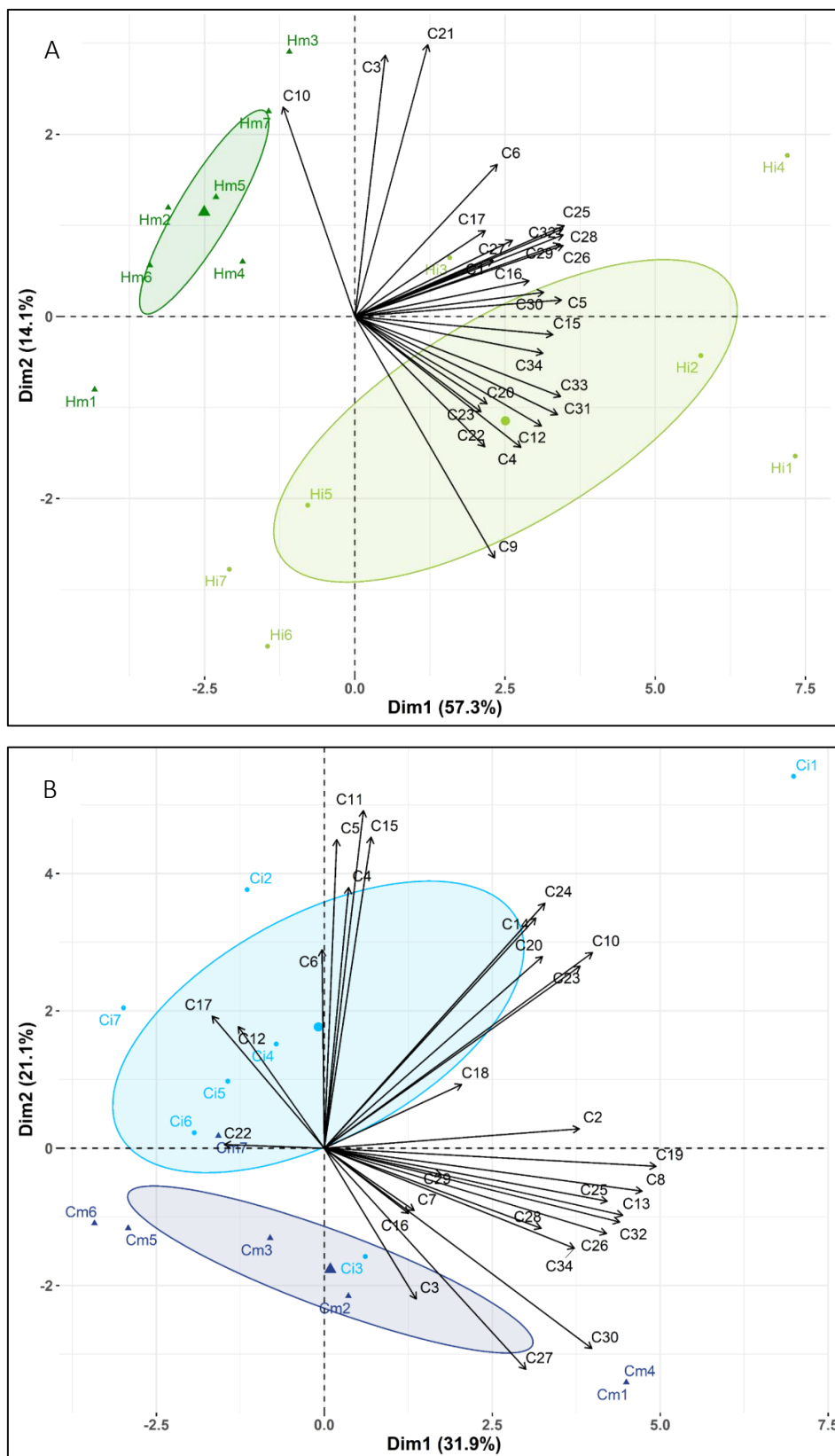


Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) da composição dos compostos orgânicos voláteis emitidos por plantas de milho infectadas ou não pelo fitoplasma do enfezamento-vermelho. A. Voláteis do genótipo P4285VYHR infectado (Hi) e “mock” (Hm). B. Voláteis do genótipo SCS156 Colorado infectado (Ci) e “mock” (Cm). Os números acompanhados da letra C correspondem aos compostos descritos na Tabela 1.

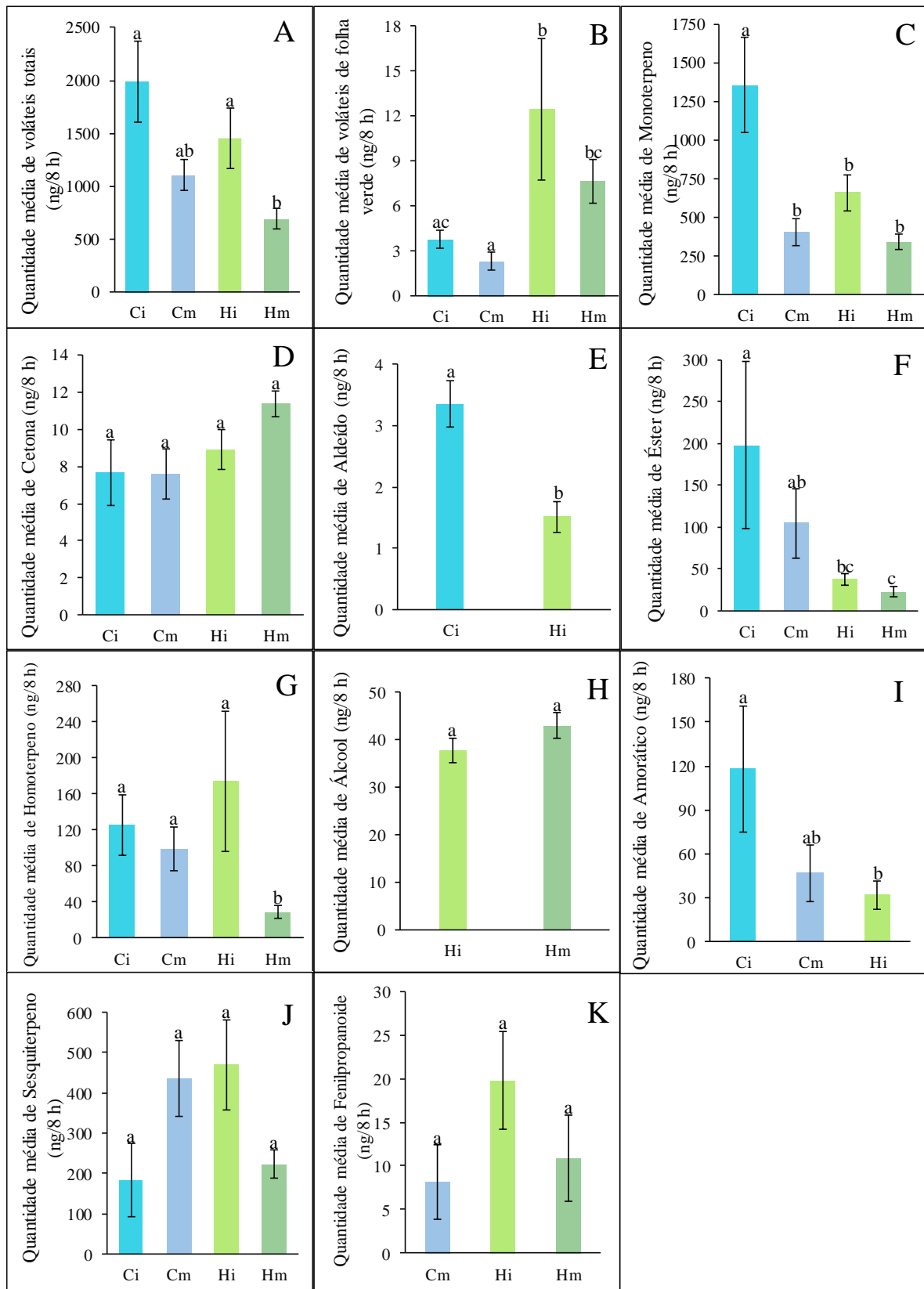


Figura 8. Quantidade média (\pm SE) dos compostos orgânicos voláteis emitidos (ng/ 8 h) por genótipos de milho infectados ou não pelo fitoplasma do enfezamento-vermelho. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos analisados por GLM com distribuição Gama ou Gaussiana inversa e teste Tukey. P4285VYHR infectado (Hi), P4285VYHR “mock” (Hm), SCS156 Colorado infectado (Ci) e SCS156 Colorado “mock” (Cm).

4.3 Resultado da detecção molecular do fitoplasma do enfezamento-vermelho do milho

A Figura 9 mostra o resultado das análises PCR para detecção de fitoplasma do enfezamento-vermelho em plantas de milho infectadas com esse fitopatógeno. Os testes de PCR foram feitos em todas as plantas consideradas infectadas nos bioensaios comportamentais e na coleta de voláteis utilizadas ainda na fase assintomática da doença.

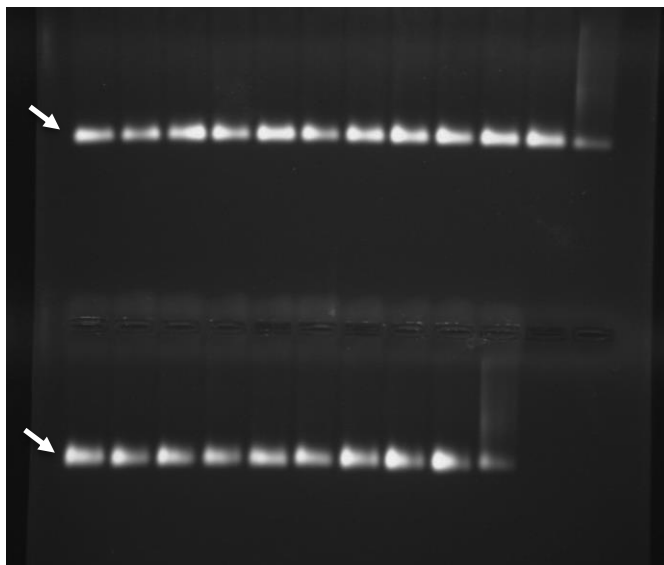


Figura 9. Resultados de PCR para detecção do fitoplasma do enfezamento-vermelho do milho aos 55 dias após a inoculação.

Ao observar a eletroforese em gel (Figura 9) foi possível confirmar a presença do fitoplasma do enfezamento-vermelho em todas as plantas testadas, uma vez que todas as bandas produzidas na altura de ~1.500 pares de bases (indicadas pelas setas) foram semelhantes ao controle positivo (última banda de cada linha), ou seja, uma planta em que a infecção por esse fitopatógeno já havia sido confirmada por PCR anteriormente.

5. DISCUSSÃO

A cigarrinha-do-milho, *D. maidis*, foi capaz de reconhecer e responder aos voláteis emitidos pelos genótipos de milho SCS156 Colorado e P4285VYHR. Para o genótipo híbrido, houve preferência pelos voláteis de plantas infectadas pelo fitoplasma do enfezamento-vermelho. O mesmo não foi observado para o genótipo SCS156 Colorado, onde a cigarrinha respondeu preferencialmente aos COVs emitidos pelas plantas mock. Além disso, a cigarrinha não apresentou resposta preferencial quando os voláteis dos dois genótipos foram contrastados. No entanto, as análises químicas dos COVs mostraram diferenças quantitativas e qualitativas entre os genótipos e os tratamentos.

As cigarrinhas e outros membros da subordem Auchenorrhyncha, geralmente, são menos responsivas aos COVs no processo de seleção de planta hospedeira, quando comparados com representantes da subordem Sternorrhyncha (TODD, PHELAN & NAULT, 1990). Boa parte dos estudos com cigarrinhas sugere que as pistas olfativas atuam como um complemento às pistas visuais (COMPTON, 2002; FERÈRES & MORENO, 2009; LA GRANGE et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Contudo, existem trabalhos onde diferentes espécies de cigarrinhas podem diferenciar genótipos e/ou encontrar hospedeiros utilizando unicamente pistas olfativas. É o caso, por exemplo, de *Empoasca fabae* (Harris), que é capaz de diferenciar variedades de alfafa a partir dos destilados a vapor de suas folhas (RANGER et al., 2005); de *Cicadulina storeyi*, que consegue discriminar os COVs de plantas de milho infestadas e não infestadas (OLUWAFEMI et al., 2011); e *D. maidis*, em que já foi observado uma interação de estímulos visuais e olfativos durante a busca hospedeira (TODD et al., 1990). De acordo, com dois estudos prévios e os resultados do presente trabalho sustentam a hipótese de que *D. maidis* utiliza pistas olfativas, além de possivelmente, outros estímulos multimodais na localização de plantas hospedeiras (TODD et al., 1990; COLL ARÁOZ et al., 2019, 2020).

Alterações no comportamento de seleção hospedeira de insetos-vetores pode ser induzida diretamente, pela presença do fitopatógeno no corpo do vetor e indiretamente, como consequência das modificações fisiológicas causadas na planta pela infecção. A dinâmica para otimizar a disseminação do fitopatógeno se encaixa na hipótese de manipulação vetorial proposta por Ingwell e colaboradores (2012) (MAUCK et al., 2012; CARMO-SOUZA et al., 2014). Alguns trabalhos documentam alterações nas características das plantas causadas pela infecção de fitoplasmas (SUGIO, et al., 2011; PECHER et al., 2019; AL SUBHI et al., 2021) e outros demonstram que os fitoplasmas são capazes de influenciar a seleção hospedeira de seus vetores (MAYER et al., 2008a, 2010; SUGIO et al., 2011; ORLOVSKIS et al., 2015;

ORLOVSKIS et al., 2016). A escolha preferencial das fêmeas sadias de *D. maidis* por plantas infectadas com o fitoplasma do enfezamento-vermelho, no caso do genótipo híbrido, corrobora a hipótese de manipulação vetorial indireta (INGWEL et al., 2012), uma vez que esse comportamento contribui para o aumento da disseminação e transmissão do fitoplasma do enfezamento-vermelho para o milho, semelhante ao observado em vetores de vírus fitopatogênicos (MAUCK, DE MORAES & MESCHER, 2010). A preferência de fêmeas sadias pela planta infectada pode ser explicada pela dinâmica da infecção do fitoplasma que é capaz de modificar os COVs emitidos pelas plantas (FERERES et al., 2016). Nas relações vetor-patógeno-hospedeiro, os voláteis da planta hospedeira são os alvos mais prováveis de manipulação (MAUCK, DE MORAES & MESCHER, 2010). Em condições de campo, a movimentação de *D. maidis* em direção à planta doente facilita a aquisição do fitoplasma do enfezamento-vermelho, a oviposição e, conseqüentemente, o desenvolvimento de uma nova geração na planta infectada, que também pode adquirir o fitoplasma na fase de ninfa, e, assim, aumentar naturalmente o número de indivíduos infectados da população.

As análises dos COVs dos dois genótipos de milho apresentaram diferenças quantitativas e qualitativas. Plantas infectadas e não infectadas do genótipo híbrido diferiram significativamente na quantidade total de voláteis liberados e, a maioria dos compostos identificados, já haviam sido mencionados em outros estudos com milho (OLUWAFEMI et al., 2012; ROBERT et al., 2013; POTTER et al., 2015; COLL ARÁOZ et al., 2020). A doença induziu a liberação de seis compostos (eucaliptol, β -guaiano indol, α -muroleno, octanal e TMTT) e aumentou a quantidade liberada de nove outros compostos (ciclosativeno DMNT, *cis*- β -farneseno, α -guaiano, linalol, β -mirceno, *cis*- β -ocimeno, ylangeno e β -ylangeno). Já para o genótipo SCS156 Colorado, a doença induziu a liberação de apenas três compostos (α -acetato de terpineol, *trans*- β -ocimeno e octanal) e aumentou a emissão de dois (benzoato de metila e linalol). Dessa forma, a infecção induziu maiores alterações no genótipo híbrido. Já foi observado que adultos de *D. maidis* assentam tanto em plantas de milho saudáveis quanto naquelas infectadas com o fitoplasma do enfezamento-vermelho com sintomas iniciais, avançados e assintomáticas (GARCIA-GONZALES et al., 2018). No entanto, durante o período assintomático da doença, as cigarrinhas sadias preferiram plantas infectadas, resultado que corrobora com o obtido no presente estudo.

O composto emitido em maior quantidade pelas plantas infectadas e não infectadas dos dois genótipos de milho (P4285VYHR e SCS156 Colorado) foi o monotereno linalol. Coll Aráoz e colaboradores (2019), ao compararem dois genótipos de milho híbrido, observaram que o linalol foi liberado em maior quantidade pelo genótipo temperado e a

emissão foi quase nula no tropical. Viram ainda que *D. maidis* preferiu o híbrido temperado quando comparado com o tropical. No entanto, o linalol puro não foi atrativo à *D. maidis*, mas ao adicioná-lo à mistura natural de COVs emitidos pelo híbrido tropical, este passou a ser atrativo para a cigarrinha. Outro estudo de Coll Aráoz e colaboradores (2020), utilizando os mesmos genótipos (híbrido tropical e temperado), mais uma variedade crioula, infestados (atacadas) e não infestados com *D. maidis*, mostrou que a cigarrinha-do-milho preferiu os odores da variedade crioula não infestada quando comparado com o mesmo genótipo infestado. Diferentemente do observado no experimento citado anteriormente, *D. maidis* não foi capaz de diferenciar os odores dos híbridos temperado e tropical infestado e não infestado. Interessantemente, o linalol foi produzido em quantidades significativamente menores pelas plantas temperadas infestadas em comparação com as não infestadas, indicando que há uma supressão na sua liberação quando o milho é submetido à herbivoria pela cigarrinha. Estes resultados sugerem que o linalol, juntamente com outros compostos emitidos pelo milho, pode ter um papel importante para a localização de hospedeiros por *D. maidis*. O linalol já foi citado em outros estudos como um composto importante para a ecologia química de insetos atuando como atrativo ou repelente (CARROLL, et al., 2006; HUFF & PITTS, 2019).

As pistas específicas que provocaram as respostas de *D. maidis* preferenciais para o genótipo híbrido infectado não foram determinadas, porém, as diferenças entre as misturas voláteis liberadas pelas plantas infectadas e não infectadas sugerem possíveis candidatos, sendo eles: eucaliptol, β -guaieño, indol, α -muroloeno, octanal, TMTT, ciclosativeno, DMNT, *cis*- β -farneseno, α -guaieño, linalol, β -mirceno, *cis*- β -ocimeno, ylangeno e β -ylangeno. Os seis primeiros compostos tiveram sua liberação induzida pela infecção e os demais foram liberados em maior quantidade em plantas infectadas. No entanto, Oluwafemi e colaboradores (2011) observaram que os compostos voláteis (*E*)- β -farneseno e TMTT foram repelentes para *C. storeyi*, contrapondo o que foi observado no presente trabalho, em que as fêmeas sadias de *D. maidis* foram atraídas pelo híbrido infectado que teve o composto TMTT induzido e o (*E*)- β -farneseno liberado em maior quantidade quando comparado com o híbrido não infectado. Um estudo feito com óleo essencial de *Hemizygia petiolata* Ashby (Lamiaceae), que possui altos níveis de (*E*)- β -farneseno, o feromônio de alarme para muitas espécies de pulgões-praga da subfamília Aphididae, mostrou ter atividade biológica contra pulgões, repelindo-os em bioensaios de olfatometro e reduzindo de forma significativa seus números em ensaios de campo (BRUCE et al., 2005).

A resposta preferencial da cigarrinha-do-milho *D. maidis* provocada pelos compostos voláteis induzidos pela infecção do fitoplasma do enfezamento-vermelho precisa ser mais

amplamente explorada a fim de determinar os compostos específicos responsáveis pelo comportamento observado no presente estudo. A identificação desses compostos específicos relacionados à resposta do inseto pode ser útil no manejo do vetor, com a implementação de uma estratégia ‘push-pull’, por exemplo, que pode ser descrito como a utilização de estímulos capazes de alterar o comportamento do inseto com o objetivo de manipular sua distribuição e abundância no campo (COOK et al., 2007). Nesse tipo de estratégia, os insetos-praga são repelidos ou afastados (push) da cultura de interesse, sendo ao mesmo tempo atraídos (pull) para uma cultura armadilha, garantindo assim a proteção da cultura alvo de produção (COOK et al., 2007; HASSANALI et al., 2008). Um exemplo prático desse tipo de manejo que utilizou essa estratégia no oeste do Quênia obteve bons resultados. Eles implementaram o consórcio de milho (planta de interesse) com a planta repelente *Desmodium uncinatum* Jacq.), e acrescentaram uma planta armadilha atraente na bordadura da área de plantio, o capim Napier, *Pennisetum purpureum* Schumach (KHAN et al., 2008). Neste contexto, poderia ser adicionado o semioquímico volátil específico para atrair o inseto-praga na planta armadilha alocada na bordadura da área, com o intuito de potencializar o efeito atrativo.

6. CONCLUSÕES

1. A cigarrinha *D. maidis* reconhece os voláteis do milho híbrido P4285VYHR e responde preferencialmente para a planta infectada;
2. A cigarrinha *D. maidis* reconhece os voláteis do milho da variedade de polinização aberta SCS156 Colorado, mas nesse caso responde preferencialmente para plantas não infectadas;
3. A cigarrinha *D. maidis* não apresentou preferência entre os voláteis quando confrontado os genótipos de milho SCS156 Colorado e P4285VYHR infectados ou não com o fitoplasma do enfezamento-vermelho.
4. A doença causada pelo fitoplasma do enfezamento-vermelho do milho modifica o perfil de voláteis do milho, e no caso específico do genótipo P4285VYHR a infecção atrai o inseto;
5. A doença causada pelo fitoplasma do enfezamento-vermelho do milho provoca um aumento da produção média de voláteis totais nos dois genótipos de milho avaliados, modificando o perfil de voláteis de forma quantitativa e qualitativa.

REFERÊNCIAS

- Al-Subhi, A. M., Al-Sadi, A. M., Al-Yahyai, R. A., Chen, Y., Mathers, T., Orlovskis, Z., Moro, G., Mugford, S., Al-Hashmi, K. S., Hogenhout, S. A. 2021. Witches' Broom Disease of lime contributes to phytoplasma epidemics and attracts insect vectors. *Plant Disease*. 105(9): 2637-2648.
- Ammar, E. D., Fulton, D., Bai, X., Meulia, T., Hogenhout, S. A. 2004. An attachment tip and pili-like structures in insect and plant pathogenic spiroplasmas of the class Mollicutes. *Archives of Microbiology*. 181:97-105.
- Ammar, E. D., Gasparich, G. E., Hall, D. G., Hogenhout, S. A. 2011. Spiroplasma-like organisms closely associated with the gut in five leafhopper species (Hemiptera: Cicadellidae). *Archives of Microbiology*. 193:35-44.
- Ávila, C. J., Arce, C. C. M. 2008. Flutuação populacional da cigarrinha-do-milho em duas localidades do Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural*. 38(4):1129-1132.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*. 67(1):1-48.
- Belliure, B., Janssen, A., Maris, P. C., Peters, D., Sabelis, M. W. 2005. Herbivore arthropods benefit from vectoring plant viruses. *Ecology Letters*. 8:70-79.
- Bosque-Pérez, N. A., Eigenbrode, S. D. 2011. The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: insights from luteovirus pathosystems. *Virus Research*. 159(2):201-205.
- Bradfute, O., Tsai, J., Gordon, D. T. 1981. Corn stunt spiroplasma and viruses associated with a maize disease epidemic in southern Florida. *Plant Disease*. 65:837-841.
- Bruce, T. J. A., Birkett, M. A., Blande, J., Hooper, A. M., Martin, J. L., Khambay, B. P. S., Prosser, I., Smart, L. E., Wadhams, L. J. 2005. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolate* essential oil. *Pest Management Science*. 61:1115-1121.

- Bushing, R. W., Burton, V. E. 1974. Leafhoppers damage to silage corn in California. *Journal of Economic Entomology*. 67(5):656-658.
- Canale, M. C., Lopes, J. R. S., Nesi, C. N., Prado, S. S. 2018. Role of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) gender on maize bushy stuntphytoplasma transmission. *Phytopathogenic Mollicutes*. 8(1): 32-39.
- Carle, P., Laigret, F., Tully, J. G., Bové, J. M. 1995. Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45:178-181
- Carlioni, E., Carpane, P., Paradell, S., Laguna, I., Giménez-pecci, M. P. 2013. Presence of *Dalbulus maidis* (hemiptera: cicadellidae) and of *Spiroplasma kunkelii* in the temperate region of Argentina. *Journal of Economic Entomology*. 106:1574-1581.
- Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Garzo, E., Fereres, A. 2014. A non-persistently transmitted-virus induces a pull–push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Research*. 186:38-46.
- Carroll, M. J., Schmelz, E. A., Meagher, R. L., Teal, P. E. 2006. Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. *Journal of Chemical Ecology*. 32:1911-1924.
- Castilhos, R. V., Parizotto, C., Bermudez, F., Ribeiro, L. P., Canale, M. C. 2022. Severity of corn stunt disease on maize genotypes in the Midwest of the Brazilian State of Santa Catarina. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 21:1278.
- Castle, S. J., Mowry, T. M., Berger, P. H. 1998. Differential settling by *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) on various viruses infected host plants. *Annals of the Entomological Society of America*. 91:661-667.
- Cavichioli, R. R., Takiya, D. M. 2012. Subordem Auchenorrhyncha Duméril, 1806. In: Rafael, J. A., Melo, G. A. R., Carvalho, C. J. B., Casari, S. A., Constantino, R. (ed.). *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia*. São Paulo: Holos, 359-368.

Chang C. J. 1998. Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle. *Phytopathology*. 88:1347-1350.

Coelho, A. M, Landau E. C., Sabato, E. O. 2017. Épocas de semeadura do milho e incidência de doenças causadas por mollicutes. In: Oliveira E., Oliveira C.M. Doenças em milho: insetos vetores, mollicutes e vírus. Embrapa Informação Tecnológica, p. 271.

Coll Aráoz, M., Jacobi, V., Fernandez, P., Luft Albarracin, E., Virla, E., Hill, J., Catalán, C. 2019. Volatiles mediate host-selection in the corn hoppers *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae). *Bulletin of Entomological Research*. 109(5):633-642.

Coll-Aráoz, M. V., Hill, J. G., Luft-Albarracin, E. *et al.* 2020. Modern maize hybrids have lost volatile bottom-up and top-down control of *Dalbulus maidis*, a Specialist Herbivore. *Journal of Chemical Ecology*. 46:906–915.

Companhia nacional de abastecimento (CONAB). 2020a. Observatório agrícola. Acompanhamento da safra de grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>.

Companhia nacional de abastecimento (CONAB). 2020b. Available at: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>.

Companhia nacional de abastecimento (CONAB). 2021. Série histórica das safras. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=20>.

Cook, A. G., Denno, R. F. 1994. Planthopper plant interactions: feeding behavior, plant nutrition, plant defense, and host plant specialization. pp. 114–139 in Denno, R.F. & Perfect, T.J. (Eds) *Planthoppers: Their Ecology and Management.*, Boston, Springer.

Cook, S. M., Khan, Z. R., Pickett, J. A. 2007. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*. 52:375-400.

Costa, A. S., Kitajima, E. W. 1973. Ocorrência do enfezamento do milho em plantações de Petrolina, PE. *Fitopatologia* 8:7.

Costa, A. S., Kitajima, E. W., Arruda, S. C. 1971. Moléstias de vírus e de micoplasma no milho em São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*. 4:39–41.

Cota, L. V., Oliveira, I. R., Silva, D. D., Mendes, S. M., Costa, R. V., Souza, I. R. P., Silva, A. F. 2021. Manejo da cigarrinha e enfezamentos na cultura do milho. Cartilha EMBRAPA e sistema FAERP/SENAR-PR.

Davis, R. 1966. Biology of the leafhopper *Dalbulus maidis* at selected temperatures. *Journal of Economic Entomology*. 59(3):766.

Davis, R. E., Shao, J., Dally, E. L., Zhao, y., Gasparich, G. E., Gaynor, B. J., Athey, J. C., Harrison, N. A., Donofrio, N. 2015. Complete genome sequence of *Spiroplasma kunkelii* strain cr2-3x, causal agent of corn stunt disease in *zea mays*. *Genome announcements*. 3:E01216-15.

Davis, R. E., Worley, J. F. 1973. Spiroplasma: motile, helical, microorganism associated with corn stunt disease. *Phytopathology*. 63:403-408.

Doebley, J. F., Iltis, H. H. 1980. Taxonomy of *zea* (gramineae). I. A subgeneric classification with key to taxa. *American Journal of Botany*. 67:982-993.

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

Ebbert, M. A., Nault, L. R. 2001. Survival in *Dalbulus* leafhopper vectors improves after exposure to maize stunting pathogens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 100:311-324.

Eckel, R. V. W., Lampert, E. P. 1996. Relative attractiveness of tobacco etch virus-infected and healthy flue-cured tobacco plants to aphids (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*. 89:1017-1027.

Eigenbrode, S. D., Ding, H., Shiel, P., Berger, P. H. 2002. Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 269:455-460.

FAOSTAT. Food Agriculture Organization of the United Nations. 2022.

Fereres, A., Peñaflor, M. F. G. V., Favaro, C. F., Azevedo, K. E. X., Landi, C. H., Maluta, N. K. P., Bento, J. M. S., Lopes, J. R. S. 2016. Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. *Viruses*. 8:225.

Fereres, A., Moreno, A. 2009. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research*. 141:158-168.

Fernandes, F. T., Balmer, E. 1990. Situação das doenças de milho no Brasil. *Informativo Agropecuário*. 14(165):40-45.

Fletcher, J., Melcher, U., Wayadande, A. 2006. The phytopathogenic spiroplasmas, In the *Prokaryotes*, Eds. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. New York: Springer. 905-947.

Force, D. C. 1972. R-and k-strategists in endemic host-parasitoid communities. *Bulletin of the Entomological Society of America*. 18(3):135-137.

Franco, F. P., Moura, D. S., Vivanco, J. M., Silva-filho, M. C. 2017. Plant–insect–pathogen interactions: a naturally complex ménage à trois. *Current Opinion in Microbiology*. 37:54-60.

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

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

Gonzales, V., Gámez, R. 1974. Algunos factores que afectan la transmisión del virus del rayado fino del maíz por *Dalbulus maidis* delong & wolcott. Turrialba. 24:51-57.

Gonzalez, G. J., Jaramillo, G. M., Roberto, Lopes, J. R. S. 2018. Undetected infection by Maize Bushy Stunt Phytoplasma enhances host-plant preference to *Dalbulus maidis* (hemiptera: cicadellidae). Environmental entomology. 47(2):396-402.

González, J. G., Tanaka, F. A. O., Lopes, J. R. S. 2016. First findings in the route of the Maize Bushy Stunt Phytoplasma within its vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). Journal of Economic Entomology. 109:966-968.

Hassanali, A., Herren, H., Khan, Z. R., Pickett, J. A., Woodcck, C. M. 2008. Integrated pest management: the push–pull approach for controlling insect pests and weeds of cereals, and its potential for other agricultural systems including animal husbandry. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences. 63:611-621.

Heady, S. E., Madden, L. V., Nault, L. R. 1985. Oviposition behavior of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). Annals of the Entomological Society of América. 78(6):723-727.

Heady, S. E., Nault L. R. 1985. Escape behavior of *Dalbulus* and *Baldulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). Environmental Entomology. 14:154-158.

Heady, S. E., Nault, L. R. 1984. Leafhopper egg microfilaments (Homoptera: Cicadellidae). Annals of the Entomological Society of America. 77(5):610-615.

Huff, R. M., Pitts, R.J. 2019. An odorant receptor from *Anopheles gambiae* that demonstrates enantioselectivity to the plant volatile, linalool. PLoS One. 14(11):e0225637.

Hunt, R. E., Nault, L. R. 1991. Roles of interplant movement, acoustic communication, and phototaxis in mate-location behavior of the leafhopper *Graminella nigrifrons*. Behavioral Ecology and Sociobiology. 28:315-320.

Hurd, H. 2003. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. Annual Review of Entomology. 48:141-161.

Ingwell, L. L., Eigenbrode, S. D., Bosque-Pérez, N. A. 2012. Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports*. 2:1-6.

International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. "Minutes of the Interim Meetings, 1 and 2 August 1992, Ames, Iowa." 1993. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43:394-397.

International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. "Minutes of the interim meetings. 12 and 18 July 1996, Orlando, Florida". 1997. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47:911-914.

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

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

Jimenez-Martinez, E. S., Bosque-Pérez, N. A., Berger, P. H., Zemetra, R. S., Ding, H., Eigenbrode, S. D. 2004. Volatile cues influence the response of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) to *Barley yellow dwarf virus*-infected transgenic and untransformed wheat. *Environmental Entomology*. 33:1207-1216.

Khan, Z. R., Midega, C. A. O., Amudavi, D. M., Hassanali, A., Pickett, J. A. 2008. On-farm evaluation of the 'push-pull' technology for the control of stemborers and striga weed on maize in western Kenya. *Field Crops Research*. 106(3):224-233.

Kitajima E. W., Costa, A. S. 1972. Microscopia eletrônica de microrganismos tipo micoplasma nos tecidos de milho afetado pelo enfezamento e nos órgãos da cigarrinha vetora portadora. *Bragantia* 31:75-87.

Kunkel, L. O. 1926. Studies on aster yellows. *American Journal of Botany*. 23:646-705.

La Grange, R., Schröder, M., Glinwood, R., Ignell, R., Krüger, K. 2017. Leafhopper interactions with host plants – a role for volatile cues? IOBC-WPRS Bulletin. 126:22-26.

Larsen, K. J., Nault, L. R., Moya-Raygoza, G. 1992. Overwintering biology of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae): adult populations and drought hardiness. Environmental Entomology. 21:566-577.

Lee, I. M., Gundersen-rindal, D. E., Davis, R. E., Bartoszyk, M., Laboratoyz, B., Arsi Beltsville, U. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on rflp analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 48:1153-1169.

Lefèvre, T., Koella, J. C., Renaud, F., Hurd, H., Biron, D. G., Thomas, F. 2006. New prospects for research on manipulation of insect vectors by pathogens. PLoS Pathogens. 2:72.

Lefèvre, T., Thomas, F. 2008. Behind the scenes, something else is pulling the strings, emphasizing parasitic manipulation in vector-borne diseases. Infection, Genetics and Evolution. 8:504-519.

Leopold, E. J. 1990. Selective hydroboration of a 1, 3, 7-triene: homogeneraniol. Organic Syntheses. 64: 164–171.

MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O.V., et al. 2011. Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. Plant Physiology. 157:831-841.

Madden, L. V., Nault, L. R., Heady, S. E., Styer, W. E. 1986. Effect of temperature on the Population dynamics of three *Dalbulus* leafhoppers species. Annals of applied biology. 108: 475-485.

Mann, R. S. et al. 2012. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. PLOS Pathogens. 8(3):1-13.

- Mann, R., Sidhu, J., Butter, N., Sohi, A., Sekhon, P. 2008. Performance of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) on healthy and cotton leaf curl virus infected cotton. *Florida Entomologist*. 91(2): 249–255.
- Marín, R. 1987. Biología y comportamiento de *Dalbulus maidis* (homóptera: cicadellidae). *Revista Peruana de Entomología*. 30:113-117.
- Maris, P. C., Joosten, N. N., Goldbach, R.W., Peters, D. 2004. *Tomato spotted wilt virus* infection improves host suitability for its vector *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology*. 94: 706-711.
- Markham, P. G., Townsend, R., Bar-Joseph, M., Daniels, M. J., Plaskitt, A., Meddins, B. M. 1974. Spiroplasmas are the causal agents of citrus little-leaf disease. *Annals of Applied Biology*. 78:49-57.
- Massola Junior, N. S. 1998. Avaliação de danos causados pelo enfezamento-vermelho e enfezamento-pálido na cultura do milho. 75f. Tese (doutorado) - universidade de São Paulo, escola superior de agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba.
- Matthews, L., Haydon, D. T., Shaw, D. J., Chase-topping, M. E., Keeling, M. J., Woolhouse, M. E. J. 2003. Neighborhood control policies and the spread of infectious disease. *Proceedings of the Royal Society B*. 270:1659-1666.
- Mauck, K., Bosque-Perez, N., Eigenbrode, A. S., De Moraes, C. M., Mescher, M. C. 2012. Transmission mechanisms shape pathogen effects on host–vector interactions: evidence from plant viruses. *Functional Ecology*. 26(5): 1162-1175.
- Mauck, K. E., De Moraes, C. M., Mescher, M. C. 2016. Effects of pathogens on sensory-mediated interactions between plants and insect vectors. *Current Opinion in Plant Biology*. 32:53-61.
- Mauck, k. E.; De Moraes, C. M.; Mescher, M. C. 2010. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(8):3600-3605.

Mayer C. J., Vilcinskas, A., Gross J. 2008a. Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior. *Journal of Chemical Ecology*. 34:1518-1522.

Mayer, C. J., Vilcinskas, A., Gross J. 2008b. Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. *Journal of Chemical Ecology*. 34: 1045–1049.

Mayer, C.J.; Vilcinskas, A.; Gross, J. 2010. Chemically mediated multitrophic interactions in a plant-insect vector-phytoplasma system compared with a partially nonvector species. *Agricultural and Forest Entomology*. 13(1):25-35.

Mazzoni, V., Ioriatti, C., Trona, F., Lucchi, A., De Cristofaro, A., Anfora, G. 2009. Study on the role of olfaction in host plant detection of *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae) nymphs. *Journal of Economic Entomology*. 102:974-980.

Mcleod, G., Gries, R., Von Reub, S. H., Rahe, J. E., Rory Mcintosh, R.; König, W. A., Gries, G. 2005. The pathogen causing Dutch elm disease makes host trees attract insect vectors. *Proceedings of the Royal Society B*. 272:2499-2503.

Medina-Ortega, K. J., Bosque-Pérez, N. A., Ngumbi, E., Jiménez-Martínez, E. S., Eigenbrode, S. D. 2009. *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) responses to volatile cues from *Barley Yellow Dwarf Virus*-infected wheat. *Environmental Entomology*. 38:836-845.

Mendes, L. O. T. 1938. Observações sobre alguns insetos coletados sobre algodoeiro durante os anos de 1936 e 1937. *Boletim técnico Instituto Agrônômico*. 45:1-15.

Meneses, A. R. 2015. Dinâmica populacional de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) e seus parasitoides em cultivos de milho no nordeste brasileiro. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí, Teresina.

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

Moral, R. A., Hinde, J., Demétrio, C. G. B. 2017. Half-normal plots and overdispersed models in r: the hnp package. *Journal of Statistical Software*. 81(10):1-23.

Moya-Raygoza, G., Hogenhout S. A., Nault, L. R. 2007. Habitat of the corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) during the dry (winter) season in Mexico. *Environmental Entomology*. 36(5):1066-1072.

Moya-Raygoza, G., Nault, L. R. 1998. Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 91:668-676.

Nault, L. R. 1980. Maize Bushy Stunt and Corn Stunt: A Comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology*. 70:659-662.

Nault, L. R. 1983. Origins in Mesoamerica of maize viruses and mycoplasmas and their leafhopper vectors. In: Plumb R. T., Thresh, J. M. (Eds). *Plant virus epidemiology. The spread and control of insect-borne viruses*. Blackwell scientific publications, Oxford. 259–266, ref. 48.

Nault, L. R. 1990. Evolution of an insect pest: maize and the corn leafhopper, a case study. *Maydica*. 35:165-175.

Nault, L. R., DeLong, D. M. 1980. Evidence for co-evolution of leafhoppers in the genus *Dalbulus* (Cicadellidae: Homoptera) with maize and its ancestors. *Annals of the Entomological Society of América*. 73:349-353.

Nault, L. R., Madden, L. V. 1985. Ecological strategies of *Dalbulus* leafhoppers. *Ecological Entomology*, v. 10, p. 57-63.

Ngumbi, E., Eigenbrode, S. D., Bosque-Pérez, N. A., Ding, H., Rodriguez, A. 2007. *Myzus persicae* is arrested more by blends than by individual compounds elevated in headspace of PLRV-infected potato. *Journal of Chemical Ecology*. 33:1733-1747.

Oliveira C. M., Lopes, J. R. S., Dias, C. T. S., Nault, L. R. 2004c. Influence of latitude and elevation on polymorphism among population of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. *Environmental Entomology*. 33:1192-1199.

Oliveira E., Magalhães, P. C., Gomide, R. L., Vasconcelos, C. A., Souza, I. R. P., Oliveira, C. M., Cruz, I., Schaffert, R. E. 2002a. Growth and nutrition of mollicute-infected maize. *Plant Disease*. 86:945–949.

Oliveira, C. M., Auad, A. M., Mendes, S. M., Frizzas, M. R. 2014. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection*. 56:50-54.

Oliveira, C. M., Frizzas, M. R. 2022. Eight decades of *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera, Cicadellidae) in Brazil: what we know and what we need to know. *Neotropical Entomology*. 51:1-17.

Oliveira, C. M., Lopes, J. R. S. 2004a. Cigarrinha-do-milho: aspectos taxonômicos e ecológicos, sobrevivência na entressafra. In: *Doenças do milho: Mollicutes, Vírus, Vetores e Mancha por Phaeosphaeria*, Eds. Oliveira, C.M., Oliveira, E. Sete lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 61-88.

Oliveira, C. M., Lopes, J. R. S. 2004b. Técnicas para a criação da cigarrinha-do-milho e inoculação de mollicutes e vírus em plantas. In: *Doenças do milho: Mollicutes, Vírus, Vetores e Mancha por Phaeosphaeria*, eds. Oliveira, C. M., and Oliveira, E. Sete lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 90-116.

Oliveira, C. M., Lopes, J. R. S., Querino, R. B. 2017. Rearing techniques of corn leafhopper to transmission studies and biological control. In *disease in maize: insect vectors, mollicutes and viruses*. Brasília, 1st ed.; Oliveira, C. M., Sabato, E. O., Eds.; Embrapa: Brasilia, Brasil. 1:154-176.

Oliveira, C. M., Lopes, J. R., Nault, L. R. 2013. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 147:141-153.

Oliveira, C.M., Frizzas, M.R., Oliveira, E. 2020. Overwintering plants for *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) adults during the maize off-season in central Brazil. *International Journal of Tropical Insect Science*. 40:1105–1111.

Oliveira, E., Carvalho, R. V., Duarte, A. P., Andrade, R. A., Resende, R. O., Oliveira, C. M., Recoo, P. C. 2002b. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 1:38-46.

Oliveira, E., Resende, R. O., Pecci, M. L. P. G., Laguna, I. G., Herrera, P., Cruz, I. 2003. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativas de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38:19–25.

Oliveira, E., Ternes, S., Vilamiu, R., Landau, E. C., Oliveira, C. M. 2015. Abundance of the insect vector of two different mollicutes plant pathogens in the vegetative mayze cicle. *Phytopathogenic Mollicutes*. 5:117-118.

Oliveira, E., Waquil, J. M., Fernandes, F. T., Resende, R. O., Kitajima, E. W. 1998. “Enfezamento-pálido” e “Enfezamento-vermelho” na cultura do milho no Brasil central. *Fitopatologia Brassileira*. 23(1):45-47.

Oluwafemi, S., Birkett, M. A., Caulfield, J., Pickett, J. A. 2012. Variability of volatile organic compounds emitted by seedlings of seven African maize varieties when infested by adult *Cicadulina storeyi* China leafhopper vectors of maize streak virus. *African Crop Science Journal*. 20:17-124.

Oluwafemi, S., Bruce, T. J. A., Pickett, J. A., Ton, J., Birkett, M. A. 2011. Behavioral responses of the leafhopper, *Cicadulina storeyi* China, a major vector of maize streak virus, to volatile cues from intact and leafhopper-damaged maize. *Journal of Chemical Ecology*. 37:40-48.

Orlovkis, Z., Canale, M. C., Thole, V., Pecher, P., Lopes, J. R. S., Hogenhout, S. A. 2015. Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. *Current Opinion in Insect Science*. 9:16-23.

Orlovskis, Z., Canale, M. C., Haryono, M., Lopes, J. R. S., Kuo, C. H., Hogenhout, S. A. 2017. A few sequence polymorphisms among isolates of maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Annals of Botany*. 119:869-884.

Orlovskis, Z., Canale, M. C., Haryono, M., Lopes, J. R. S., Kuo, C. H., Hogenhout, S. A. 2017. A few sequence polymorphisms among isolates of Maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Annals of Botany*. 119(5):869-884.

Orlovskis, Z., Hogenhout, S. A. 2016. A Bacterial Parasite Effector Mediates Insect Vector Attraction in Host Plants Independently of Developmental Changes. *Frontiers in Plant Science*. 7:885.

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

Pitre, H. N. 1967. Greenhouse studies of the host range of *Dalbulus maidis*, a vector of the corn stunt virus. *Journal of Economic Entomology*. 60:417-421.

Pitre, H. N. 1970. Observations on the life cycle of *Dalbulus maidis* on three plant species. *Florida Entomologist*. 53:33.

Potter, T. L., Olson, D. M., Ni, X., Rains, G. C. 2015. A re-examination of corn (*Zea mays* L.) ear volatiles. *Phytochemistry Letters*. 14:280-286.

Poulin, R., Thomas, F. 1999. Phenotypic variability induced by parasites: Extent and evolutionary implications. *Parasitology Today*. 15(1):28-32.

Powell, G., Tosh, C. R., Hardie, J. 2006. Host plant selection by aphids: Behavioral, Evolutionary, and Applied Perspectives. *Annual Review of Entomology*. 51:309-330.

- Ramos, A., Esteves, M. B., Cortés, M. T. B., Lopes, J. R. S. 2020. Maize bushy stunt phytoplasma favors its spread by changing host preference of the insect vector. *Insects*. 11(9):600.
- Ranger, C. M., Winter, R. E. K., Backus, E. A., Rottinghaus, G. E., Ellersieck, M. R., Johnson, D. W. 2005. Discrimination by potato leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) of host volatiles from resistant and susceptible alfalfa, *Medicago sativa* L. *Environmental Entomology*. 34:271-280.
- Ribeiro, L. P., Canale, M. C. 2021. Cigarrinha-do-milho e o complexo de enfezamentos em Santa Catarina: panorama, patossistema e estratégias de manejo. *Agropecuária Catarinense*. 34:22-25.
- Ribeiro, L. P., Dedonatti, E., Nesi, C. N. 2018. Management of southern corn rootworm and leafhoppers by treating seeds: field assessments in maize second crop in Southern Brazil. *Maydica*. 63(8):1-8.
- Robert, C. A. M., Erb, M., Hiltbold, I., Hibbard, B. E., Gaillard, M. D. P., Bilat, J., Degenhardt, J., Cambet-Petit-Jean, X., Turlings, T. C. J., Zwahlen, C. 2013. Genetically engineered maize plants reveal distinct costs and benefits of constitutive volatile emissions in the field. *Plant Biotechnology Journal*. 1:1-12.
- Roy, B. A., Raguso, R. A. 1997. Olfactory versus visual cues in a floral mimicry system. *Oecologia*. 109:414-426.
- Sabato, E. O. 2017. Enfezamentos do milho in: Oliveira, E. O., Oliveira, C. M. (Ed.) *Doenças em milho: insetos vetores, mollicutes e vírus*. Embrapa Informação Tecnológica. 12-24.
- Sabato, E. O. 2018. Manejo do risco de enfezamento e da cigarrinha-do-milho. *Embrapa milho e sorgo, Circular Técnica*. 226:17.
- Sabato, E. O., Landau, E. C., Barros, B. A., Oliveira, C. M. 2020. Differential transmission of phytoplasma and spiroplasma to maize caused by variation in the environmental temperature in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. 157:163-171.

Saillard, L. C., Vignault, L. J. C., Bové, L. J. M., Raie, A., Tully, J. G., Williamson, D. L., Fos, A., Garnier, M., Gadeau, A., Carle, P., Whitcomb, R. F. 1987. *Spiroplasma phoeniceum* sp. nov., a New Plant-Pathogenic Species from Syria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 37:106-115.

Sanches, P. A., Santos, F., Peñaflor, M. F. G. V., Bento, J. M. S. 2017. Direct and indirect resistance of sugarcane to *Diatraea saccharalis* induced by jasmonic acid. *Bulletin of Entomological Research*. 107(6):828-838.

Santana, P.A., Kumar, L., Da Silva, S. R., Pereira, J. L., Picanço, M. C. 2019. Assessing the impact of climate change on the worldwide distribution of *Dalbulus maidis* (DeLong) using MaxEnt. *Pest Management Science*. 75:2706-2715.

Searle, S. R., Speed, F. M., Milliken, G. A. 1980. Population marginal means in the linear model: an alternative to least squares means. *The American Statistician*. 34(4):216-221.

Sisterson, M. S. 2008. Effects of insect-vector preference for healthy or infected plants on pathogen spread: Insights from a model. *Journal of Economic Entomology*. 101(1):1-8.

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

Srinivasan, R., Alvarez, J. M., Eigenbrode, S. D., Bosque-Pérez, N. A. 2006. Influence of hairy nightshade *Solanum sarrachoides* (Sendtner) and Potato leafroll virus (Luteoviridae: Polerovirus) on the host preference of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*. 35(2):546-553.

Stafford, C. A., Walker, G. P., Ullman, D. E. 2011. Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A.* 108(23):9350-9355.

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

Sugio, A., Kingdom, H. N., MacLean, A. M., Grieve, V. M., Hogenhout, S. A. 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108:1254-1263.

Summers, C. G., Newton, A. S., Opgenorth, D. C. 2004. Overwintering of corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), and *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) in California's San Joaquin Valley. *Environmental Entomology*. 33(6):1644-1651.

Tanumiharhardjo, S. A., Mcculley, L., Roh, R., Lopez-Ridaura, S., Palacios-Rojas, N., Gunaratna, N. S. 2020. Maize agro-food systems to ensure food and nutrition security in reference to the sustainable development goals. *Goals Food Security*. 25:1-9.

Taylor, R. A. J., Nault, L. R., Styer, W. E. 1993. Experimental analysis of flight activity of three *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Auchenorrhyncha) in relation to migration. *Annals of the Entomological Society of America*. 86:655-667.

Thomas, F., Adamo, S., Moore, J. 2005. Parasitic manipulation: Where are we and where should we go? *Behavioural Processes*. 68:185-199.

Thottappilly, G., Bosque-perez, N. A., Rossel, H. W. 1993. Viruses and virus diseases of maize in tropical Africa. *Plant Pathology*. 42:494-509.

Todd, J. L., Madden, L. V., Nault, L. R. 1991. Comparative growth and spatial distribution of *Dalbulus* leafhoppers populations (Homoptera: Cicadellidae) in relation to maize phenology. *Environmental entomology*. 20(2):556-564.

Todd, J. L., Phelan, P. L., Nault, L. R. 1990. Interaction between visual and olfactory stimuli during host-finding by leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Chemical Ecology*. 16:2121-2133.

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

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

Toruño, T. Y., Stergiopoulos, L., Coaker, G. Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology*. 54:419-441.

Triplehorn, B. W., Nault, L. R. 1985. Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the macrostelini. *Annals of the Entomological Society of America*. 78(3):291–315.

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

Tsai, J. H., DeLong, D. M. 1989. Descriptions of new species of *Dalbulus* and *Balclutha*, from Ecuador (Homoptera, Cicadellidae: Deltocephalinae). *Entomotaxonomia*. 11:283-287.

USDA. United States Department of Agriculture. World agricultural production. 2022. Disponível em: < <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>.

Van den dool, H; Kratz, P. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*. 11: 463-471.

Vilanova, E. S. 2021. Efeito do estágio de desenvolvimento da planta e densidade populacional do inseto vetor, *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), sobre a transmissão e danos do fitoplasma do milho. Dissertação (mestrado), USP-ESALQ. 83p.

Vilanova, E.S., Ramos, A., Souza de Oliveira, M.C., Esteves, M.B., Gonçalves, M.C., Lopes, J.R. 2022. First Report of a Mastrevirus (Geminiviridae) Transmitted by the Corn Leafhopper. *Plant Disease*. 106(5): 1330-1333.

Virla, E. G., Paradell, S. L., Diez, P. A. 2003. Estudios bioecológicos sobre la chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (Insecta - Cicadellidae) en Tucumán (Argentina). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. 29:17-25.

Waquil, J. M. 1997. Amostragem e abundância de cigarrinhas e danos de *Dalbulus maidis* (Delong e Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) em plântulas de milho. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 26(1):27-33.

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

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

Weintraub, P. G., Beanland, L. 2006. Insect Vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*. 51:91-111.

Werner, B. J., Mowry, T. M., Bosque-Pérez, N. A., Ding, H., Eigenbrode, S. 2009. Changes in green peach aphid responses to potato leafroll virus induced volatiles emitted during disease progression. *Environmental Entomology*. 38(5):1429-1438.

Wilkes, H. G. 1972. Maize and its wild relatives: Teosinte and *Tripsacum*, wild relatives of maize, figured prominently in the origin of maize. *Science*. 177:1071-1077.

Williamson, D. L., Adams, J. R., Whitcomb, R. F., Tully J. G., Carle P., Konai M., *et al.* 1997. *Spiroplasma platyhelix* sp. nov., a new mollicute with unusual morphology and genome size from the dragonfly *Pachydiplax longipennis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 47(3):763-766.

Williamson, D. L., Whitcomb, R. F., Tully, J. G., Gasparich, G. E., Rose D. L., Carle P., *et al.* 1998. Revised group classification of the genus *Spiroplasma*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 48(1):1-12.

Wordell Filho, J. A., Chiaradia, L. A., Ribeiro, L. P., Madalóz, J. C., Nesi, C. N. 2016. Pragas e doenças do milho: diagnose, danos e estratégias de controle. Florianópolis: Epagri, 82p. (boletim técnico, 170).

Zhang, X., Pengsakul, T., Tukayo, M., Yu, L., Fang, W., Luo, D. 2017. Host-location behavior of the tea green leafhopper *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae): olfactory and visual effects on their orientation. *Bulletin of Entomological Research*. 25:1-11.

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